

Fabiana de Fátima Ferreira

**TOXICIDADE DO METILMERCÚRIO (MeHg) SOBRE A
ORGANIZAÇÃO DAS CAMADAS DA MEDULA ESPINHAL DE
EMBRIÕES DE *Gallus domesticus***

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento – PGBCD – da Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC – como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutora em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Yara Maria Rauh Müller

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Evelise Maria Nazari

Florianópolis
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Ferreira, Fabiana
TOXICIDADE DO METILMERCÚRIO (MeHg) SOBRE A ORGANIZAÇÃO
DAS CAMADAS DA MEDULA ESPINHAL DE EMERIÕES DE Gallus
domesticus / Fabiana Ferreira ; orientador, Yara Muller
; coorientador, Evelise Nazari. - Florianópolis, SC, 2015.
117 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-
Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Inclui referências

1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2.
neurotoxicologia. 3. metilmercúrio . 4. desenvolvimento
embrionário. 5. medula espinhal. I. Muller, Yara . II.
Nazari, Evelise. III. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do
Desenvolvimento. IV. Título.

Dedico este trabalho
ao Clodoaldo,
companheiro de todas as horas...

AGRADECIMENTOS

À Deus, força maior

À Mãe, Nossa Senhora Aparecida e à todos os amigos do plano espiritual que me ampararam nesta trajetória! **Minha eterna gratidão!**

À minha família

Aos anjos que Deus colocou em meu caminho Luci Leal Martins, Dr. José Ernani Leal, Fernando Fonseca e Dr^a. Carolina T. Yatsugafu

Aos amigos queridos Solenir Ruffato, Carlos Sérgio Aissa, Marco Donisete de Campos, Maria José Paes, Solange Bonaldo, Rosmari Preto, Flávia Del Castanhel, Eliane Zeni, Simone A. Ferreira, Cláudia R. Marquetti Chaves, Patrícia Auerswald Munhoz, Joselina da Silva e Luciana (*in memorian*)

À minha primeira orientadora Prof^a. Dr^a. Cloris Ditzel Faraco

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Yara M.R. Muller e à minha coorientadora Prof^a. Dr^a. Evelise M. Nazari pela acolhida, lições de vida e de ciência, e pela confiança em mim depositada! **Muito obrigada!**

Ao Prof. Dr. Dib Ammar e a Prof^a. Dr^a. Karoline K. Bianchini pelo apoio técnico. **Muito obrigada!**

A todos os companheiros do Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento – BEG - UFSC: Eliane, Heloísa, Aline, Valquíria, Tais, Gilian, Luciane, Thaline, Neide, Karoline, Manuela, Christian, Cláudia, M^a Luiza, Carla, Ana Gabriela, Guilherme, Mariana, Saulo, e tantos outros que passaram pelo laboratório nos últimos 5 anos. **Obrigada pelo apoio e pelos bons momentos compartilhados!**

À UFSC e à Capes pelo suporte estrutural e financeiro

À Tyson do Brasil - São José- SC, pela doação dos ovos, especialmente ao funcionário Sr. Wilson

A todos os professores do Programa de pós-graduação em Biologia Celular do Desenvolvimento, bem como aos professores dos programas de pós-graduação em Neurociências, Biologia Molecular e Bioquímica que contribuíram para o meu aprendizado.

Aos técnicos da UFSC: da Secretaria Integrada de Pós-Graduação do CCB, da Secretaria do Depto. BEG, dos LAMEBs (Bibiana, Vanessa, Denis, Chyrle, Emily, Demétrio), do LCME (Eliana). **Muito obrigada!**

À equipe do laboratório de Biologia Vegetal sob a coordenação da Prof^ª. Dr^ª. Zenilda L. Bouzon especialmente aos doutores Éder C. Schmidt e a Carmem Simioni. **Muito Obrigada!**

Aos diretores da UFMT Campus de Sinop: Ricardo Lopes Tortorela de Andrade, Frederico Terra de Almeida, Paulo de Andrade Moreira e ao Pró-Reitor Marco Antônio A. Pinto que permitiram meu afastamento para realização das atividades do doutorado. **Muito obrigada!**

Agradeço aos colegas de trabalho da UFMT: Leandro Denis Battirola, Ednaldo Alves, Claudineli C. Bueno, Carmem Wobeto, Deise M. Uriu, Roberto C. Beber, Vanessa Retuci, Lee Shung e Evonete Sene. **Obrigada pelo apoio!!!**

“A persistência é o caminho do êxito”.
Charles Chaplin

RESUMO

Os efeitos neurotóxicos do metilmercúrio (MeHg) são bem conhecidos, mas informações mais detalhadas sobre a sua ação durante o desenvolvimento embrionário ainda são escassas. Este estudo teve como objetivo caracterizar os efeitos do MeHg sobre a organização ultraestrutural e sobre os mecanismos celulares e moleculares envolvidos no desenvolvimento das camadas da medula espinhal, utilizando embriões de *Gallus domesticus* como modelo. No terceiro dia embrionário (E3), os embriões foram tratados *in ovo* com uma única dose de cloreto de metilmercúrio (ClMeHg) (0,1 µg diluído em 50 µL de salina) e avaliados no décimo dia embrionário (E10). As análises morfológicas e morfométricas da medula espinhal foram realizadas a partir de secções histológicas coradas com HE. A localização e quantificação dos marcadores relacionados ao ciclo celular e dano ao DNA foram obtidos a partir de técnicas de imunohistoquímica e citometria de fluxo. Adicionalmente, foram realizados o ensaio de TUNEL, para a identificação de células em apoptose e análise por microscopia eletrônica de transmissão, para investigar possíveis danos ultraestruturais. Nossos resultados mostraram significativa deposição de mercúrio nas três camadas da medula espinhal, as quais apresentaram alteração na expressão de marcadores relacionados ao controle do ciclo celular, proliferação e morte celular. O aumentado número de células γH2A.X-positivas observado na camada de manto indica dano ao DNA, o qual pode ser a causa do aumento na expressão de p21 e consequente retenção do ciclo celular na fase G1. A exposição ao MeHg também causou alterações nos componentes subcelulares das células da medula espinhal, principalmente nas mitocôndrias que apresentaram edemas e rupturas de membranas, além do aparecimento de formas mitocondriais incomuns *cup-like* (em cálice) e *donut-like* (em anel). Esses danos podem estar associados com o aumento da morte celular na camada do manto, a qual parece ser mais afetada após a exposição ao MeHg. A redução da proliferação associada a aumento da morte celular, mostraram que uma única dose de MeHg foi capaz de perturbar mecanismos celulares essenciais causando redução na espessura das camadas da medula espinhal. Do ponto de vista toxicológico, estes resultados são importantes porque mostram que a exposição ao MeHg, *in ovo*, altera a medula espinhal em desenvolvimento e pode levar a possíveis comprometimentos neuromotores na vida pós-natal.

Palavras-chave: Embriões de galinha. Neurotoxicidade. Metilmercúrio. Medula espinhal. Ciclo celular. Proliferação celular. Morte celular.

ABSTRACT

The neurotoxic effects of methylmercury (MeHg) are well known, but more detailed information on its action during embryonic development are still scarce. This study aimed to characterize the effects of MeHg on the ultrastructural organization and on the molecular and cellular mechanisms involved in the development of spinal cord layers, using *Gallus domesticus* embryos as a model. At third embryonic day (E3), the embryos were treated *in ovo* with a single dose of methylmercury chloride (ClMeHg) (0.1 µg diluted in 50 µL saline) and evaluated at the tenth embryonic day (E10). The morphological and morphometric analyses of the spinal cord were taken from histological sections stained with HE. The localization and quantification of the cell cycle related and DNA damage markers were performed by immunohistochemistry and flow cytometry techniques. Additionally, TUNEL assay was used to apoptosis identification and transmission electron microscopy was conducted to investigate ultrastructural damage. Our results showed significant mercury deposition in the three spinal cord layers, which had alterations in expression of markers related to cell cycle control, proliferation and cell death. The increased number of γH2A.X-positive cells observed in the mantle layer indicates DNA damage, which may be the cause of the p21 expression increased and consequent cell cycle arrest in G1 phase. The MeHg exposure also caused changes on subcellular components of spinal cord cells, mainly in mitochondria that showed swelling and membrane disruptions, beyond the appearance of unusual *cup-like* and *donut-like* shapes. These damage may be associated with increased cell death in the mantle layer, which appears to be the most affected layer after the MeHg exposure. The decreased cell proliferation associated to the increased cell death showed that a single dose of MeHg was able to disrupt essential cellular mechanisms, causing reduction in thickness of the spinal cord layers. From a toxicological point of view, these results are important because showed that *in ovo* MeHg exposure changes the developing spinal cord and can leads to potential neuromotor impairments in the postnatal life.

Keywords: Chicken embryos. Neurotoxicity. Methylmercury. Spinal cord. Cell cycle. Cell proliferation. Cell death.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Neurulação primária em vertebrados	18
Figura 2. Representação esquemática da formação das camadas da medula espinhal de vertebrados. Formação das camadas da medula espinhal em vertebrados.....	20
Figura 3. Desenvolvimento das camadas da medula espinhal em galinha (<i>Gallus domesticus</i>)	21
Figura 4. Ciclo do mercúrio nos ambientes naturais	23
Figura 5. Representação esquemática do ciclo celular e algumas moléculas envolvidas com seu controle.....	32
Figura 6. Manuseio de ovos e tratamento dos embriões de <i>Gallus domesticus in ovo</i>	44
Figura 7. Análise morfométrica da medula espinhal.....	46
Figura 8. Peso total dos embriões E10 dos grupos controle e tratado com MeHg.....	54
Figura 9. Deposição de mercúrio na medula espinhal em embriões em E10	55
Figura 10. Espessura das camadas da medula espinhal de embriões em E10.....	56
4	
Figura 11. Efeito do MeHg sobre a proliferação celular nas camadas da medula espinhal de embriões em E10.....	58
Figura 12. Expressão de proteínas p21 na medula espinhal de embriões em E10.....	59
Figura 13. Expressão de proteínas ciclina E na medula espinhal de embriões em E10.....	59

Figura 14. Dano ao DNA na medula espinhal em embrião em E10.....	60
Figura 15. Morte celular na medula espinhal de embriões em E10.....	61
Figura 16. Efeito do MeHg sobre o sistema de endomembranas das células da medula espinhal em embriões em E10.....	63
Figura 17. Efeito do MeHg sobre as mitocôndrias na medula espinhal de embrião em E10.....	65
Figura 18. Quantificação das mitocôndrias e formas mitocondriais incomuns em embriões em E10.....	66
Figura 19. Efeito do MeHg sobre o perfil mitocondrial de fusão e fissão na medula espinhal de embriões em E10.....	67
Figura 20. Mitofagia na medula espinhal de embriões em E10 tratados com MeHg.....	69
Figura 21. Morte celular autofágica na medula espinhal de embriões tratados com MeHg.....	70
Figura 22. Expressão da proteína β -tubulina III na medula espinhal de embriões em E10.....	72
Figura 23. Resumo esquemático dos efeitos do MeHg sobre a medula espinhal de embriões em E10.....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Efeito do MeHg sobre a espessura das camadas da medula espinhal.....56

Tabela 2 Análise quantitativa das mitocôndrias na camada do manto de embriões sem E10.....68

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Anticorpos primários e secundários utilizados para as técnicas de imunohistoquímica.....	48
Quadro 2. Anticorpos primários e secundários utilizados para as técnicas de citometria de fluxo.....	49
Quadro 3. Efeito do MeHg sobre os mecanismos celulares de proliferação, morte e diferenciação; e expressão de marcadores de ciclo celular e dano ao DNA.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Bcl2	Do inglês <i>B-cell lymphoma 2</i>
Bak	Do inglês <i>Bcl2-antagonist killer</i>
Bax	Do inglês <i>Bcl-2-associated X protein</i>
BMPs	Proteínas morfogenéticas ósseas (do inglês, <i>bone morphogenetic proteins</i>)
Cdk	Do inglês <i>cyclin-dependent kinases</i>
DAB	3,3-diaminobenzidina
DAPI	4,6-diamidina-2-fenilindol
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês, <i>desoxirribonucleic acid</i>)
DRP-1	Proteína ligada a fissão mitocondrial (do inglês, <i>dynammin-related protein 1</i>)
DTN	Defeitos do tubo neural
E	Dia embrionário
EPA	Agência de Regulamentação Ambiental dos Estados Unidos da América (do inglês, <i>Environmental Protection Ambient Agency</i>)
FBS	Soro fetal bovino (do inglês, <i>fetal bovine serum</i>)
FSC-A	Definição para o parâmetro tamanho, do inglês, <i>forward scatter</i>
GFAP	Proteína ácida fibrilar da glia (do inglês, <i>glial fibrillary acidic protein</i>)
GPx	Glutathione peroxidase
GR	Glutathione reductase
HE	Hematoxilina e eosina
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HOX	Genes homeóticos
IgG	Imunoglobulina G
Mfn	Mitofusina (do inglês <i>Mitofusin</i>)
PBS	Tampão fosfato salino (do inglês, <i>phosphate buffered saline</i>)
PCNA	Antígeno marcador de proliferação celular (do inglês, <i>proliferating cell nuclear antigen</i>)
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PHH3	Fosfo-histona H3 (do inglês, <i>phospho histone H3</i>)
PN	Dia pós-natal
ppb	Partes por bilhão
ROS	Espécies reativas de oxigênio (do inglês, <i>reactive oxygen species</i>)
RNA	Ácido ribonucleico (do inglês, <i>ribonucleic acid</i>)

RNS	Espécies reativas de nitrogênio (do inglês, <i>reactive nitrogen species</i>)
Shh	Do inglês, <i>sonic hedgehog</i>
SNC	Sistema nervoso central
SOD	Enzima superóxido dismutase
SSC-A	Definição para o parâmetro complexidade (do inglês, <i>side scatter</i>)
TUNEL	Porção terminal de DNA fragmentado (do inglês, <i>transferase terminal dUTP nick end labeling</i>)
mm	Milímetro (10^{-3} do metro)
μm	Micrômetro (10^{-6} do metro)
nm	Nanômetro (10^{-9} do metro)
OMS	Organização Mundial de Saúde
γ -H2A.X	Forma fosforilada da histona H2A envolvida na organização nucleosomal da cromatina

SUMÁRIO

I	INTRODUÇÃO.....	17
1.1	NEURULAÇÃO E ORGANIZAÇÃO DA MEDULA ESPINHAL.....	17
1.2	CICLO E TRANSFERÊNCIA DO MERCÚRIO NA CADEIA TRÓFICA.....	22
1.3	NEUROTOXICIDADE INDUZIDA POR METILMERCÚRIO.....	25
1.4	EFEITOS DO MeHg SOBRE O SISTEMA NERVOSO CENTRAL EM DESENVOLVIMENTO.....	30
1.5	MITOCONDRIA COMO ORGANELA ALVO DO MeHg.....	34
1.6	EMBRIOTOXICIDADE POR METILMERCÚRIO.....	37
1.7	JUSTIFICATIVA DA PESQUISA.....	39
1.8	HIPÓTESES.....	40
II	OBJETIVOS.....	41
2.1	OBJETIVO GERAL.....	41
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41
III	MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
3.1	MATERIAL DE ESTUDO.....	43
3.2	DEFINIÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	43
3.3	PROCESSAMENTO PARA MICROSCOPIA DE LUZ.....	45
3.3.1	Análise morfológica e morfométrica da medula espinhal.....	46
3.3.2	Autometalografia de TIMM (AMG)	46
3.3.3	Marcações celulares por imunohistoquímica.....	47
3.3.4	Ensaio de TÚNEL	48
3.4	ANÁLISE POR CITOMETRIA DE FLUXO	49
3.5	ANÁLISE POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.....	50
3.6	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	51

IV	RESULTADOS.....	53
4.1	A INTERFERÊNCIA DO MeHg NA ESPESSURA DAS CAMADAS DA MEDULA ESPINHAL	54
4.2	EFEITO DO MeHg SOBRE A PROLIFERAÇÃO E CICLO CELULAR.....	57
4.3.	EFEITO GENOTÓXICO DO MeHg SOBRE A MEDULA ESPINHAL.....	60
4.4	EFEITO DO MeHg SOBRE A MORTE CELULAR	61
4.5	ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DA MEDULA ESPINHAL	62
4.6	EFEITO DO MeHg SOBRE A DIFERENCIAÇÃO NEURONAL..	71
4.7	RESUMO DOS RESULTADOS OBTIDOS.....	71
V	DISCUSSÃO.....	75
5.1	A INCORPORAÇÃO DO MeHg E SEU EFEITO SOBRE AS CAMADAS CELULARES DA MEDULA ESPINHAL	75
5.2	EFEITO DO MeHg SOBRE O CICLO CELULAR	77
5.3	DANOS CELULARES INDUZIDOS PELO MeHg	78
VI	CONCLUSÕES	85
6.1	PERSPECTIVAS	86
VII	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87

I. INTRODUÇÃO

A diferenciação do Sistema Nervoso Central (SNC) é um processo lento, gradual e bastante complexo, sensível à ação de agentes endógenos e exógenos que podem comprometer e/ou influenciar sua morfofisiologia.

Metais pesados são agentes prejudiciais ao sistema nervoso de vertebrados em estágio adulto (HARADA, 1995; CLARCKSON, 2003; ASCHNER et al., 2007; FRANCO et al., 2009; FARINA et al., 2013) e durante o desenvolvimento (FARINA et al., 2003; CHOW et al., 2008; FUJIMURA et al., 2009; MULLER et al., 2012), podendo ocasionar perturbações que levam a alterações morfológicas, bioquímicas e comportamentais.

Dentre as formas orgânicas de mercúrio, o metilmercúrio vem sendo amplamente investigado por seus efeitos toxicológicos. Assim, na presente introdução apresentaremos um panorama sobre a formação do Sistema Nervoso Central (SNC) e a neurotoxicidade do metilmercúrio.

1.1 NEURULAÇÃO E ORGANIZAÇÃO DA MEDULA ESPINHAL

O SNC estabelece-se precocemente no desenvolvimento, através de um processo que envolve movimentos morfogenéticos dinâmicos, denominado neurulação. Estimulado por moléculas produzidas pela notocorda, este processo promove a transformação de uma lâmina de ectoderma neural (placa neural) em um tubo rudimentar, o tubo neural, o qual exhibe regionalização rostro-caudal, médio lateral e dorsoventral que definirão as características e funções do sistema nervoso (SN), formado por encéfalo e medula espinhal (SMITH; SHOENWOLF, 1997; SHOENWOLF, 2009) (Fig. 1).

De acordo com a região corporal do animal, a formação do tubo neural pode ocorrer de maneira diferente. Em vertebrados são bem conhecidas a neurulação primária e secundária.

A neurulação primária ou anterior é bem conservada em vertebrados, estende-se do encéfalo até a região truncal e envolve o processo de transformação da placa em sulco e tubo neural, pela fusão das pregas neurais na linha médio-dorsal (COLAS; SCHOENWOLF, 2001) (Fig. 1). A neurulação secundária, ou posterior, envolve a formação mais caudal do tubo neural, e ocorre por processos de cavitação de uma estrutura cordonal (SCHOENWOLF; DELONGO,

1980) podendo ocorrer de modo diferente entre as espécies (LOWERY; SIVE, 2004).

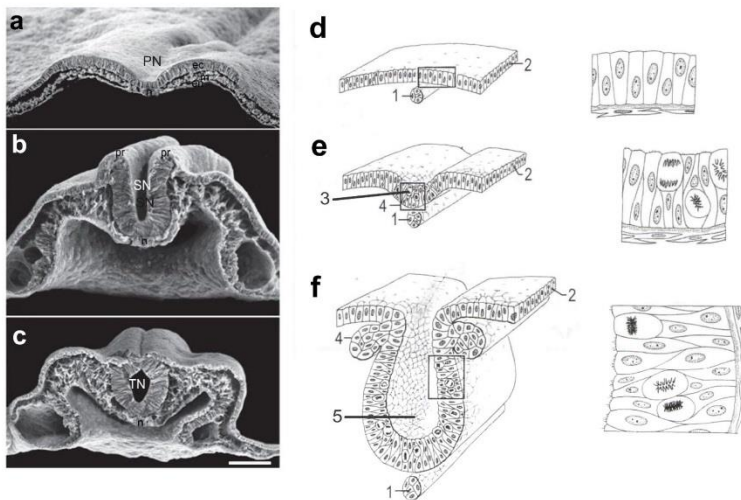


Figura 1. Neurulação primária em vertebrados. Imagens de microscopia eletrônica de varredura em vista transversal (a – c). Formação da placa neural (a). Aproximação e fusão das pregas neurais (b). Tubo neural formado (c). Representação esquemática da neurulação primária (d – f) com formação de placa neural (d), sulco neural inicial (e), sulco neural em estágio tardio (f). Os quadros estão representados em detalhe na coluna à direita ilustrando a organização do neuroepitélio. Abreviaturas: *ec*, ectoderme de revestimento; *en*, endoderme; *m*, mesoderme; *n*, notocorda; *PN*, placa neural; *pr*, prega neural; *SN*, sulco neural; *TN*, tubo neural; 1, Notocorda; 2, Ectoderme; 3, Sulco neural; 4, Gânglio dorsal; 5, Prega neural. Barra de escala: 20 µm. Fonte: a – c: modificado de Colas e Schoenwolf (2001), d – f: Modificado de Hyttel; Sinowatz; Vejlsted, 2012.

O tubo neural é constituído por uma única camada celular, o neuroepitélio, e está submetido à ação de diversas moléculas morforregulatórias responsáveis pela indução e padronização do neuroeixo. Entre estas moléculas estão os fatores de transcrição da família HOX (MALLO; WELLIK; DESCHAMPS, 2010) que são responsáveis pela segmentação corporal e especialização regional dos órgãos incluindo o Sistema Nervoso (SN). O neuroepitélio é formado por células neurais indiferenciadas, que expressam os genes Notch (JUSTICE; JUN, 2002; CORNELL; EISEN, 2005;) e Sox 3 (BYLUND

et al., 2003), possuem alto potencial mitótico e, através de migração e citodiferenciação, são responsáveis pela organização das camadas que compõem o SNC

Células originadas a partir do tubo neural migram periféricamente para estabelecer a camada do manto (ou intermediária) (Fig. 2). Nesta camada, neurônios jovens pós-mitóticos expressam os genes *Neuro M* e *Neuro D* (ROZTOCIL et al., 1997), que promovem a transição proliferação - diferenciação (VIECELI et al., 2013). Neurônios diferenciados expressam Beta tubulina classe III Tuj 1 (β -tub III) (LEE et al., 1990) e SCG10 (STEIN et al., 1988). Os axônios destes neurônios diferenciados crescem periféricamente a partir da camada do manto, organizando a camada mais externa, denominada marginal (SHOENWOLF, 2009).

As camadas do manto e marginal também serão povoadas pelas células gliais, em grande parte originadas a partir do neuroepitélio. Essas células realizam suporte metabólico e estrutural do SNC, destacando-se entre elas a glia radial, que orienta a migração dos neurônios, tanto no encéfalo, quanto na medula espinhal (BENTIVOGLIO; MAZZARELLO, 1999). As células gliais, particularmente os astrócitos, expressam vários tipos de proteínas, entre elas a proteína ácida fibrilar da glia (GFAP, do inglês, glial fibrillary acidic protein), amplamente utilizada em estudos de desenvolvimento (MAMBER et al., 2012). Assim é estabelecido em vertebrados o padrão estrutural de medula espinhal, constituído por três camadas (ependimal, manto e marginal) (Fig. 2).

Por estímulos das moléculas sinalizadoras BMP (do inglês *bone morphogen protein*) (SHOU; RIM; CALOF, 1999), Shh (do inglês *sonic hedgehog*) (ERICSON et al., 1995) e Wnt (ortólogo do gene *Wingless* de drosófila) (CADIGAN; NUSSE, 2004), e como resultado da migração celular, ocorre a regionalização da medula em placas dorsais relacionadas a funções sensoriais e placas ventrais relacionadas a funções motoras. Estas regiões são facilmente reconhecidas quando a medula espinhal é analisada em secções transversais, forma usual na qual são realizadas análises microscópicas desta região do SNC (ERICSON et al., 1992).

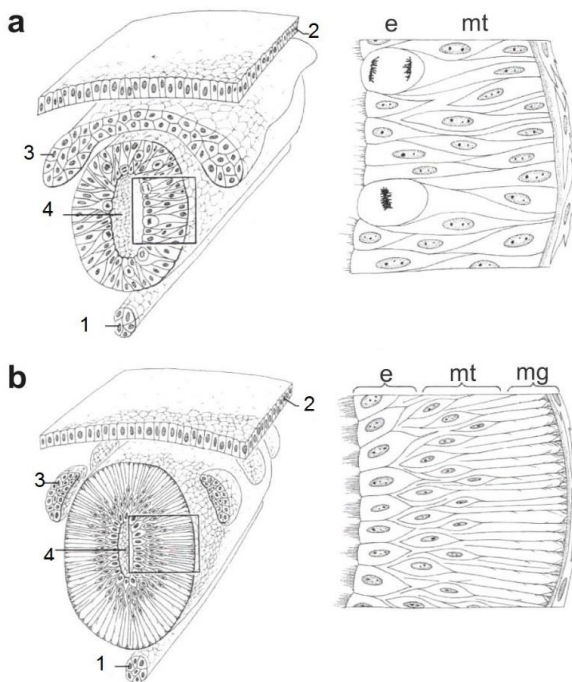


Figura 2. Representação esquemática da formação das camadas da medula espinhal de vertebrados. Coluna à esquerda- secções transversais de tubo neural em desenvolvimento. Coluna à direita - detalhe do neuroepitélio diferenciando-se em camadas endodimal (e) e do manto (mt). Tubo neural com camadas endodimal e do manto bem definidas. Muitas mitoses na região endodimal **(a)**. Camadas endodimal, do manto e marginal (mg) definidas. Camada endodimal mais central com células ciliadas. Camada do manto com células em diferenciação. Camada marginal apresentando prolongamentos neuronais **(b)**. Legenda: 1, Notocorda; 2, Ectoderme de revestimento; 3, Gânglio dorsal; 4, Tubo neural. Fonte: Modificado de Hyttel; Sinowatz; Vejlsted, 2012.

A medula espinhal em desenvolvimento apresenta importantes características que a tornam um bom modelo de estudo de embriotoxicidade, como por exemplo a separação em camadas endodimal, manto e marginal, as quais podem ser analisadas individualmente, verificando o comportamento das células com relação aos mecanismos de proliferação, diferenciação e morte após o tratamento com um agente estressor, como um metal pesado. Em embriões de galinha no terceiro dia embrionário (E3) o tubo neural já

está formado e o neuroepitélio vai apresentando gradualmente diferenciação em 3 camadas teciduais (ependimal, do manto e marginal), as quais são claramente visualizadas no estágio E5 em diante (Fig. 3). Em E10 a medula está completamente organizada, com regiões dorsal e ventral bem definidas, podendo ser vistos grandes corpos celulares na região do manto, bem como prolongamentos axonais na região marginal. Esse estágio está em pleno período de diferenciação, porém possui células proliferando na camada endependimal.

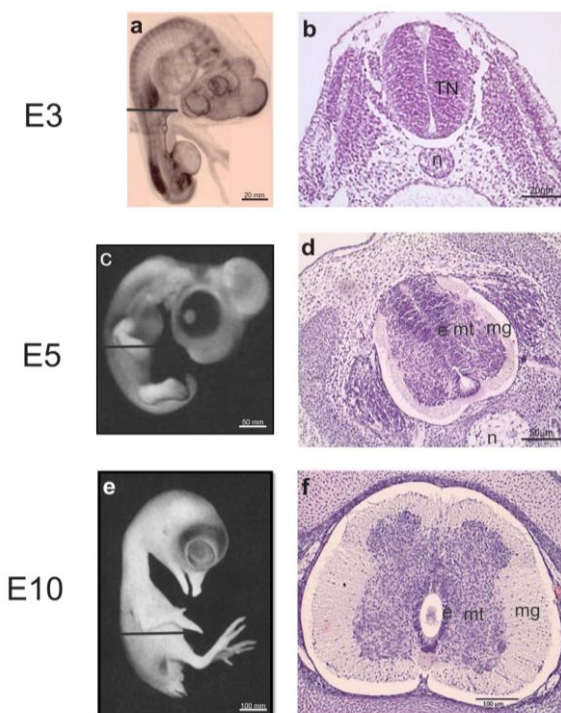


Figura 3. Desenvolvimento das camadas da medula espinal em *Gallus domesticus*. Embrião em estágio E3 (a – b). Secção transversal ilustrando tubo neural (TN) e notocorda (n) (b). Embrião em estágio E5 (c – d). Secção transversal de E5 ilustrando camadas da medula espinal endependimal (e), do manto (mt) e marginal (mg) em diferenciação (d). Embrião em estágio E10 (e – f). Medula espinal em secção transversal com as suas camadas bem definidas f. Barra em a, c, e indica nível da seção transversal. Fonte: Fotos a, c, e: modificadas de Hamburger e Hamilton (1951). Fotos b, d e f: Fotos obtidas pelo autor.

1.2 CICLO E TRANSFERÊNCIA DO MERCÚRIO NA CADEIA TRÓFICA

Emissões de mercúrio ocorrem naturalmente a partir de vulcões, sedimentos oceânicos, desgaseificação da crosta e por incêndios florestais. Fontes antropogênicas de mercúrio são a mineração; a indústria com a fabricação de lâmpadas, baterias, chapas metálicas, amálgamas dentários, termômetros esfigmomanômetros e antifúngico em tintas (CECCATELLI et al., 2010). Embora os efeitos adversos do mercúrio para a saúde sejam conhecidos, ele ainda continua sendo utilizado como conservante em vacinas (CRESPO LOPES et al., 2009). Uma vez liberado no ambiente, os compostos contendo mercúrio entram no ciclo do mercúrio (MOREL; KRAPIEL, 1998) e podem ser bioacumulados e biomagnificados em diferentes níveis da cadeia trófica (TAVARES; CARVALHO, 1992).

O mercúrio existe em três formas principais que diferem com respeito à sua toxicocinética, distribuição, acumulação e ciclagem no ambiente: mercúrio metálico (Hg^0), íons inorgânicos (Hg^+ e Hg^{2+}) e mercúrio orgânico (etil e metilmercúrio) (SYVERSEN; KAUR, 2013). O mercúrio metálico (elementar) é líquido à temperatura ambiente, tendo menor toxicidade nesta forma, porém se aquecido, evapora tornando-se altamente tóxico, podendo ser inalado e incorporado pelos pulmões. Íons inorgânicos podem ser monovalentes (íon mercurioso Hg^+) ou bivalentes (forma mercúrica Hg^{2+}), formando sais de mercúrio usados em diversas atividades como por exemplo, no preparo de corantes histológicos como a hematoxilina, que contem óxido de mercúrio. As formas orgânicas (etil e metilmercúrio) são geradas a partir de mercúrio inorgânico em rios, lagos e oceanos, como resultado da atividade de metilação de bactérias sulforedutoras (ACHÁ et al., 2011) e representam a forma mais estável e prejudicial à saúde dos animais e ao ambiente (GRANDJEAN; LANDRIGAN, 2006) (Fig. 4).

A toxicidade de metilmercúrio aumenta devido a sua biomagnificação através da cadeia trófica, processo que consiste na de bioacumulação e biotransferência do metal de um dado nível trófico para o nível trófico imediatamente superior (KEHRIG et al., 2011). Com relação à cadeia trófica, MeHg pode ser acumulado por mais de sete ordens de concentrações, da ordem de sub nanograma/litro (ng/L) na água para mais de 1 mg/kg em peixes carnívoros (HINTELMANN, 2010), causando alta biomagnificação em peixes predadores, aves e mamíferos (SCHEUHAMMER et al., 2007).

Alguns incidentes com mercúrio (na forma de metilmercúrio) são amplamente conhecidos por envolverem casos graves de envenenamento no Japão e no Iraque. O consumo de peixe contaminado por resíduos industriais no Japão nas décadas de 1950 e 1960 (HARADA, 1995; YORIFUJI et al., 2011) e o consumo de sementes contaminadas por fungicidas a base mercúrio no Iraque na década de 1970 (BAKIR et al., 1973) levaram a intoxicação de centenas de pessoas com sintomas variando de náuseas, problemas motores e sensoriais, distúrbios comportamentais, até mortes.

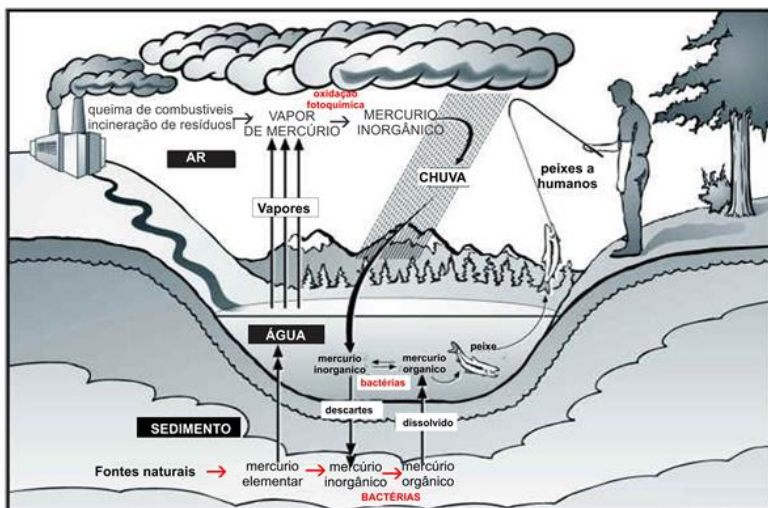


Figura 4 - Ciclo do mercúrio nos ambientes naturais. Fonte: modificado de <http://www.mercury.utah.gov>

O lançamento de resíduos industriais e de mineradoras em rios, mares e manguezais favorece a contaminação dos organismos aquáticos que são consumidos por aves e mamíferos, incluindo os humanos. A alimentação é a principal fonte de exposição ao mercúrio de modo que a maior parte da população humana apresenta baixos níveis de mercúrio em seu organismo (MAHAFFEY et al., 2011). A mudança dos hábitos alimentares e a grande aceitação da culinária oriental nas últimas décadas contribui para o aumento significativo no consumo de alimentos à base de frutos do mar, o que também contribui para o possível aumento desse metal nos humanos (CLARKSON; MAGOS, 2006). Além da questão alimentar, algumas populações são mais expostas à

contaminação por mercúrio, como por exemplo os trabalhadores que sofrem exposição ocupacional, como mineradores, trabalhadores de indústrias e profissionais de saúde que utilizam materiais e equipamentos contendo mercúrio.

As comunidades ribeirinhas próximas das áreas de garimpo também sofrem uma exposição crônica a níveis relativamente elevados de mercúrio devido a sua dieta rica em peixe (SÁ et al., 2006). A atividade de garimpo desenvolveu-se amplamente no Brasil, na década de 1980 e 1990, deixando resíduos que ainda hoje permanecem contaminando o ambiente; e em alguns locais restritos esta atividade ainda é desenvolvida. Neste método artesanal de mineração, o mercúrio (Hg^0) é utilizado para extrair o ouro, e os resíduos de Hg permanecem no ambiente, contaminando os rios e suas margens (DOLBEC et al., 2001; AMORIM et al., 2000, CRESPO LOPEZ et al., 2011). A legislação brasileira determina que a água potável pode conter no máximo 0,1 $\mu g/L$ de mercúrio (BRASIL, 2004), já corpos de água doce, salina ou salobra têm limites máximos de 0,2 $\mu g/L$ (BRASIL, 2005).

A ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), estabelece, através da portaria 685/1998, que os valores máximos de mercúrio em peixes não predadores é 0,5 mg/kg e, para peixes predadores de 1,0 mg/kg, sendo o valor de 0,3 mg/kg sugerido para casos em que o consumo é frequente (BRASIL, 1998). Estudos realizados em áreas utilizadas para garimpo na bacia do Tapajós o principal afluente do Rio Amazonas, mostraram menores concentrações de mercúrio em peixes onívoros, detritívoros e herbívoros e altos níveis de mercúrio concentrado em peixes carnívoros. As mais altas concentrações (acima 500 ppb) por exemplo, foram encontradas em espécies carnívoras como família Sciaenidae (*Plagisocion squamosissimus*, “pescada branca”), *Pseudoplatystoma sp.* (“surubim”), o Pimelodidae family (*Brachyplatystoma filamentosum*, “filhote”; *B. fravicans*, “dourada”) e a família Cichlidae (*Cichla sp.*, “tucunaré” (CRESPO LOPES et al., 2009).

Atualmente em populações ribeirinhas da bacia e afluentes do Rio Tapajós, os níveis de mercúrio estão mais baixos, porém ainda acima dos níveis máximos recomendados pela OMS (abaixo de 10 $\mu g/L$ no sangue e 20 $\mu g/L$ na urina) (BERZAS-NEVADO et al., 2010), indicando níveis altos de mercúrio no sangue ($> 50 \mu g/L$) e bulbo capilar ($>10\mu g/g$) (PASSOS et al., 2008, GROTO et al., 2010).

A maior parte do MeHg é absorvido pelas células do epitélio intestinal (95%), ligado a cisteína existente no lúmen intestinal (VÁZQUEZ et al., 2013) podendo também ser absorvido pela pele e

pulmões em uma menor proporção (5%) (GOCHFELD, 2003). O MeHg entra nas células por um mecanismo denominado “mimetismo molecular” bem documentado para transporte de MeHg e EtHg, o qual consiste na capacidade de estabelecer uma ligação estável com o aminoácido cisteína, formando o complexo metilmercúrio-cisteína (MeHg -Cys) ou etilmercúrio-cisteína (EtHg-Cys), que através transportador de metionina alcança o ambiente intracelular. Assim o mecanismo de “mimetismo molecular” desempenha um papel importante na mediação do transporte do mercúrio a partir do sangue para o SNC (BALLATORI et al., 2002; DÓREA; FARINA; ROCHA, 2013). Dentro das células o MeHg liga-se a grupos tióis (com grupamentos sulfidrilas-SH) presentes em biomoléculas como a glutatona (GSH), cisteína (Cys), homocisteína (Hcy), N-acetilcisteína (NAC) e albumina (BRIDGES; ZALUPS, 2010); e selenóis (com selênio em sua composição -SeH) como as enzimas como glutatona peroxidase (GPx) e tireoredoxina redutase (TrxR). A ligação do mercúrio aos tióis e selenóis é uma interação química forte, que forma complexos covalentes termodinamicamente estáveis (CECATTELLI; ASCHNER, 2005). Vários órgãos são capazes de incorporar e acumular mercúrio, por exemplo rins, fígado, retina, entre outros, sendo o SN um dos mais importantes (CLARKSON; MAGOS; MYERS, 2003).

1.3 NEUROTOXICIDADE INDUZIDA POR METILMERCÚRIO

A ação neurotóxica do metilmercúrio vem sendo amplamente investigada por causar vários distúrbios no funcionamento celular. O MeHg causa aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (OU et al., 1999; MANFROI et al., 2004; FRANCO et al., 2007) e estresse oxidativo que age sobre vários mecanismos, entre eles, o metabolismo do glutamato (ASCHNER et al., 2000; FARINA et al., 2003), a homeostase do cálcio (ASCHNER et al., 2007; RAMANATHAN; ATCHISON, 2011) levando à excitotoxicidade. O sistema de defesa antioxidante também parece ser um alvo da ação do MeHg, com redução na concentração de glutatona e aumento na atividade das enzimas antioxidantes glutatona peroxidase (GPx) e glutatona redutase (GR), importantes para combater os efeitos pró-oxidantes (FRANCO et al., 2009). Os sintomas neurotóxicos do MeHg sobre o SN são mudanças comportamentais e motoras observadas em roedores (FARINA; ROCHA; ASCHNER, 2011).

O sistema de defesa antioxidante das células tem como mais abundante tiol a molécula glutatona (GSH; γ -glutamyl-cysteinyl-glycine) (DRINGEN, 2000), cuja interação química direta com MeHg faz com que esta molécula desempenhe papel fundamental na neurotoxicidade induzida pelo MeHg (ASCHNER; SYVERSEN, 2005). Com particular ênfase na toxicidade induzida pelo MeHg, é conhecido que o átomo de mercúrio interage diretamente com o grupo tiol do GSH, levando à formação de um complexo excretável GS-HgCH₃ (BALLATORI; CLARKSON, 1982).

De importância particular, as enzimas glutatona peroxidase (GPx) e glutatona redutase (GR) são enzimas centrais na detoxicação causada por peróxido de hidrogênio e glutatona dissulfeto (glutatona oxidada- GSSG) respectivamente (DRINGEN, 2000). A atividade destas enzimas, bem como a manutenção da concentração tiol normal é representada pela razão GSH/GSSG (glutatona reduzida/glutatona oxidada), as quais são essenciais para a proteção das células evitando o dano oxidativo.

O desequilíbrio na homeostase do glutamato no SNC representa um outro fator da neurotoxicidade induzida pelo MeHg (ASCHNER et al., 2007), já que o glutamato é o principal neurotransmissor excitatório no SNC de mamíferos, desempenhando importante papel no desenvolvimento, aprendizagem, memória e resposta à lesão (FEATHERSTONE, 2010). Contudo, em concentrações elevadas na fenda sináptica (por não recaptação pelos astrócitos) o glutamato atua como uma toxina, induzindo lesão e morte neuronal (MELDRUM, 2000). Esse processo de neurotoxicidade mediada pelo glutamato é conhecido como "excitotoxicidade", referindo-se à consequência do aumento de atividade do receptor de glutamato N-metil-D-aspartato (NMDA), que leva a aumento do influxo de Na⁺ e Ca²⁺ em neurônios (CHOI, 1992; PIVOVAROVA; ANDREWS, 2010). A superativação do receptor de glutamato tipo NMDA aumenta o influxo de cálcio nos neurônios, levando à ativação de importantes vias de morte celular. Alternativamente, o Ca²⁺ pode ser captado pela mitocôndria que pode estimular a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), contribuindo assim para neurotoxicidade (FARINA et al 2011a). Além disso, o aumento nos níveis de peróxido de hidrogênio, ocasionados pela exposição ao MeHg, pode ter um papel fundamental nos efeitos oxidativos e inibitórios sobre os transportadores de glutamato nos astrócitos (ALLEN et al., 2001; FARINA et al., 2011b).

A presença do oxigênio nas células eucariotas é essencial para a sua função, tendo em vista seu papel como aceptor final de elétrons, o

que permite a geração de um gradiente de elétrons essencial para produção de ATP nas mitocôndrias (UFER; WANG, 2011). Porém esse processo biológico produz uma quantidade significativa de espécies reativas de oxigênio (ROS), como ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila (BALABAN et al., 2005), que podem ter sua formação potencializada pela interferência de algum agente estressor (UFER; WANG, 2011).

O MeHg causa desequilíbrio no metabolismo oxidativo e aumento da concentração das espécies reativas de oxigênio, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), bem como do ânion superóxido (O_2^-) e dos radicais hidroxila (OH^\cdot), por atacar os grupos nucleofílicos tiol e selenol de moléculas envolvidas no metabolismo intermediário e nos processos antioxidantes (FARINA et al., 2011a). O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é sintetizado pela enzima superóxido dismutase (SOD) na mitocôndria (LIU et al., 2002) a partir de ânion superóxido, e níveis elevados de H_2O_2 são prejudiciais às células, em grande parte devido à geração de radicais hidroxila através da reação de Fenton d Haber-Weiss (MCCORD; DAY, 1978).

Estudos utilizando mitocôndrias isoladas de cerebelo e cérebro de mamíferos mostram que o aumento do peróxido de hidrogênio afeta a atividade da cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria (principalmente os complexos I e II) (MORI et al., 2007; FRANCO et al., 2007). O ânion superóxido (O_2^-) é um subproduto do funcionamento normal da cadeia respiratória mitocondrial, é uma ROS produzida depois da redução parcial de oxigênio molecular (O_2) (CHANCE et al., 1979). Essa molécula é gerada pelos complexos I e III da cadeia respiratória mitocondrial e rapidamente convertido a H_2O_2 pela SOD (LIU et al., 2002). Estudos *in vitro* relatam grande aumento nos níveis de SOD em linhagens neurais (MORI et al., 2007) e não neurais (NAGANUMA et al., 1998) expostas a MeHg. Além disso, o superóxido é um produto da NADPH-oxidase, que é particularmente importante na ativação microglial no SNC (LAVIGNE et al., 2001).

Além das ROS, o metabolismo celular também produz algumas espécies reativas de nitrogênio (RNS), como o óxido nítrico (NO) que é uma molécula sinalizadora. Embora essas RNS desempenhem vários papéis importantes em processos biológicos, elas podem causar efeitos deletérios, incluindo a inibição de funções enzimáticas, dano ao DNA e ativação de processos inflamatórios (HOLLENBERG; CINEL, 2009). A exposição ao MeHg leva a aumento na atividade da NOS (óxido nítrico sintase) e aumento nos níveis de NO além de alteração na homeostase do cálcio (HIMI et al., 1996; HERCULANO et al., 2006). Além disso, a

mobilização do cálcio a partir do retículo endoplasmático parece ser ocasionada pela citotoxicidade mediada pelo MeHg (GASSO et al., 2001). A neurotoxicidade induzida pelo MeHg via ROS e RNS pode apresentar sinais de dano oxidativo em lipídios, proteínas e DNA em sistemas biológicos expostos a este agente tóxico.

A peroxidação lipídica tem sido registrada como uma consequência da toxicidade por MeHg (FRANCO et al., 2009; GLASER et al., 2010), e estes eventos estão relacionados ao peróxido de hidrogênio e seu precursor ânion superóxido (MORI et al., 2007; FRANCO et al., 2007), causando formação de radicais hidroxila que removem átomos de hidrogênio das cadeias lipídicas das membranas celulares (HALLIWELL; CHIRICO, 1993). Um outro fator decisivo que parece contribuir para o aparecimento de sinais de oxidação é a grande quantidade de ácidos graxos poliinsaturados no SNC, os quais são mais sensíveis à peroxidação (GRINTAL et al., 2009). Além dos lipídios presentes na membrana plasmática, as membranas de algumas organelas celulares também representam alvos importantes de peroxidação como os lisossomos (DARE et al., 2001) e as membranas mitocondriais (FRANCO et al., 2009, 2010) que podem estar relacionadas, pelo menos em parte, às características de morte celular apoptótica induzida por MeHg (CECCATELLI et al., 2010).

A interação de MeHg com grupos tióis e selenóis representa a perda do potencial nucleofílico de algumas proteínas caracterizando um “evento oxidativo”, e geralmente leva à redução ou perda nas capacidades ou funções, contribuindo de forma significativa para a neurotoxicidade. Apesar de a peroxidação lipídica e a oxidação de proteínas serem importantes características moleculares da toxicidade do MeHg, lesões oxidativas do DNA também têm sido observadas em sistemas biológicos expostos a este agente tóxico (BELLETTI et al., 2002; FARINA et al., 2011 a).

O aumento na produção de ROS causada pelo MeHg promove dano oxidativo ao DNA, que quando não reparado, leva à expressão gênica alterada com implicações importantes para o desenvolvimento, organização e função do SNC adulto ou em desenvolvimento (KHOBTA et al., 2010; WELLS et al., 2010; KITSER et al., 2011). O aumento na frequência de micronúcleos, 8-hidroxideoxiguanosina (8-OHdG) (um marcador de dano a DNA) e perturbações na segregação cromossômica em vários modelos celulares neurais e não-neurais *in vitro* (THIER et al., 2003; BONACKER et al., 2004; CRESPO-LOPEZ et al., 2007; DAS et al., 2011;) e *in vivo* são elementos indicadores de genotoxicidade do MeHg (NAGASHIMA et al., 1996; CEBULSKA-

WASILEWSKA et al., 2005; ÇAVAS et al., 2008; CRESPO-LOPES et al 2011). A 8-OHdG vem sendo amplamente usada como indicador de dano ao DNA por gerar malpareamento de bases, promovendo a formação de pares A-T ao invés de C-G, levando a erros na replicação (CRESPO LOPES, et al., 2009). A ação genotóxica das ROS sobre o material genético pode ocorrer de duas maneiras: pela ação direta sobre os ácidos nucleicos, gerando mutações (CRESPO-LOPES et al., 2009) e/ou pela indução de mudanças conformacionais nas proteínas responsáveis pela formação e manutenção do DNA, tais como enzimas de reparo, DNA polimerase, e mesmo sobre tubulinas e proteínas motoras (cinesinas) que participam da formação do fuso mitótico (THIER et al., 2003; STOIBER et al., 2004; CEBULSKA-WASILEWSKA et al., 2005). Células sanguíneas expostas a metais como mercúrio, cádmio e chumbo, apresentam sinais de genotoxicidade indicada por aumento de micronúcleos (ÇAVAS et al., 2008, CRESPO-LOPES et al., 2011) e 8-hidroxideoxiguanosina 8-OHdG (NI et al., 2014), redução do índice mitótico e comprometimento em enzimas de reparo (CEBULSKA-WASILEWSKA et al., 2005; CRESPO-LOPES et al., 2011), em humanos e em outros animais (ÇAVAS et al., 2008).

Linhagens neurais humanas (glioma e neuroblastoma) tratadas *in vitro* com MeHg apresentaram sinais de genotoxicidade, pelo alto índice de células com micronúcleos (em exposição a 0,4 η M ou 0,1 μ g/L) e menor índice mitótico (em concentração de 1 μ M) sugerindo que o MeHg pode causar danos ao DNA e inibir a proliferação celular no SNC humano mesmo em baixas doses e concentrações, o que aponta a necessidade de revisão nos valores considerados seguros pela OMS (CRESPO-LOPES et al., 2007). Além de causar danos ao DNA nuclear, estudos com linhagens gliais mostram que o MeHg também pode causar danos ao DNA mitocondrial (SHARPE et al., 2012).

Classicamente, a abordagem terapêutica para tratar a intoxicação por mercúrio é baseada no uso de agentes quelantes a tiol (HUGHES; SPARBER, 1978; CLARKSON et al., 1981) por seu potencial em remover MeHg de alvos biológicos, em particular, a partir de proteínas contendo tiol. Assim, os antioxidantes podem ser considerados como potenciais agentes protetores contra a neurotoxicidade induzida por MeHg. Evidências apontam para nutrientes antioxidantes benéficos presentes em peixes como potenciais fatores neuroprotetores (GRANDJEAN; HERZ, 2011), entre estes a presença de selênio em peixes deve ser destacada, tendo demonstrado proteger contra a toxicidade de MeHg. Estudos vêm demonstrando que compostos contendo selênio nas formas inorgânica e orgânica exibem, *in vitro* e *in*

vivo, efeitos protetores contra a ação neurotóxica do MeHg (HEATH et al, 2010; CHOI et al, 2008).

1.4 EFEITOS DO MeHg SOBRE O SNC EM DESENVOLVIMENTO

Diversos mecanismos celulares (proliferação, diferenciação, migração e morte) ocorrem durante o desenvolvimento do SNC. Quando perturbados por moléculas como os metais pesados, estes mecanismos podem sofrer desequilíbrios e causar dismorfogênese nos órgãos, sendo os danos proporcionais ao período do desenvolvimento, à dose e ao tempo de exposição (COSTA et al., 2004; CARVALHO et al., 2008; MULLER et al., 2008).

Em mamíferos em desenvolvimento, o MeHg chega ao sistema nervoso via membrana placentária e cordão umbilical (INOUE; KAJIWARA, 1990) e também pelo leite materno no período pós-natal (MANFROI et al., 2004). MeHg é transportado ativamente do sangue materno para o sangue fetal conjugado à cisteína, através do transportador de aminoácidos (KAJIWARA et al., 1996). O cérebro fetal é mais suscetível aos efeitos tóxicos devido à facilidade pela qual este xenobiótico alcança o tecido nervoso. Uma provável explicação é que nos indivíduos adultos o SNC é protegido de forma eficiente pela barreira hematoencefálica, que dificulta a passagem de agentes tóxicos para o cérebro (COSTA et al., 2004; GRANDJEAN et al., 2010).

Sendo o desenvolvimento um momento de grande demanda energética, o oxigênio em quantidades significativas torna-se essencial (TUULI et al., 2011). Entretanto, a atividade de muitas enzimas antioxidantes em embriões é muito mais baixa do que em adultos, e este é um fator que aumenta a sensibilidade dos embriões aos danos oxidativos (PARMAN et al, 1999). Além disso, o grande número de processos celulares que ocorrem nesta fase da vida (como divisão celular, migração neuronal e diferenciação) podem ser perturbados pelo estresse oxidativo, prejudicando o desenvolvimento do SNC (FARINA et al, 2011a).

O sistema de defesa antioxidante dos organismos em desenvolvimento, assim como em organismos adultos, sofre a ação oxidativa do MeHg, apresentando redução na concentração de glutathione e aumento na atividade das enzimas antioxidantes GPx e GR e distúrbio no metabolismo do glutamato, que podem ser observados de maneira dose-dependente em SN de camundongos no período pós-natal (FARINA et al., 2003; MANFROI et al., 2004; STRINGARI et al., 2008). Além disso, estudos comportamentais mostram que MeHg leva a

prejuízo neurológico que gera problemas motores e cognitivos em humanos (GRANDJEAN et al., 1997; MYERS; DAVIDSON; COX, 2003), camundongos (SAKAMOTO et al., 2002; FUJIMURA; CHENG; ZHAO, 2012), aves (CARVALHO et al., 2008) e peixes (XU et al., 2012) em desenvolvimento.

O desenvolvimento normal do SNC é lento e gradual, garantido pelo equilíbrio entre os mecanismos de proliferação, diferenciação, migração e morte de células neuronais e gliais, para organização das camadas celulares do encéfalo e da medula espinhal. A perturbação neste equilíbrio durante o desenvolvimento pode causar danos morfofisiológicos irreversíveis e comprometer a coordenação motora, aprendizagem e funções de memória no período pós-natal (GRANDJEAN et al., 1997; FARINA et al., 2011b; FUJIMURA et al., 2012; PATEL; REYNOLDS, 2013).

Evidências experimentais indicam que o MeHg afeta os processos básicos de estruturação do SNC como diferenciação neuronal (HE et al., 2012) e glial (ALLEN et al., 2001; JEBBETT et al., 2013), migração (GUO et al., 2013), crescimento de neuritos (LAWTON et al., 2007), sinaptogênese (THEUNISSEN et al., 2011; ZIMMER et al., 2011), proliferação celular (XU et al., 2010) e apoptose (MULLER et al., 2012), mesmo em baixas concentrações (CREPO LOPES, 2009).

A proliferação celular ocorre intensamente durante o período de formação do sistema nervoso e muitos ciclos de divisão celular acontecem para gerar um número significativo de células que irão estruturar este sistema (LENT, 2002). Estudos realizados com camundongos no período pós-natal mostraram que MeHg causa redução na síntese de DNA e no número de neurônios hipocámpais (BURKE et al., 2004), por perturbar a sinalização de moléculas que regulam o ciclo celular (BURKE et al., 2006; LU et al., 2011). Entre estas moléculas, as ciclinas, e as quinases dependentes de ciclinas (CDKs), formam complexos proteicos que coordenam a progressão das etapas do ciclo celular (G1, S, G2). Cada uma das fases do ciclo possui ciclinas e CDKs específicas, por exemplo, a transição da fase G1 para a fase S é controlada pela ciclina E, juntamente com a CDK2 (KOFF et al., 1992) (Fig. 5). A atividade dos complexos ciclina-CDK é controlada por uma série de proteínas reguladoras que podem estimular ou inibir a progressão do ciclo celular, entre elas podemos citar ERK, p21 e p53. A proteína ERK (do inglês *Extracellular signal-regulated kinase*), um membro da família das MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), que age para aumentar a atividade de CDKs no final da fase G1 e cuja ativação é necessária para a proliferação celular (CHAMBARD et al.,

2007), tem sua função significativamente reduzida em culturas celulares expostas a MeHg, em células adultas (PARRAN; BARONE; MUNDY, 2004; LU et al., 2011) ou fetais (XU et al., 2010). A proteína p21 é um potente inibidor de CDK2 (HARPER et al., 1993) e sob o efeito de MeHg, tem sua expressão aumentada (OU et al., 1999). O mesmo ocorre para outra importante molécula sinalizadora, a p53 (LU et al., 2011), em culturas neuronais tratadas com MeHg. A redução na expressão das ciclinas D (FALLUEL-MOREL et al., 2007) e E (BURKE et al., 2006; XU et al., 2010) resulta em retenção das células na fase G1 (XU et al., 2010) e, conseqüentemente, em redução da síntese de DNA e proliferação (BURKE et al., 2006; FALLUEL-MOREL et al., 2007). Assim, o MeHg pode interferir de várias formas na progressão do ciclo celular, seja indiretamente por alterar a atividade das moléculas que controlam o ciclo celular, ou por agir diretamente sobre as ciclinas. A médio e longo prazo, os distúrbios na proliferação celular e o acúmulo do metal no sistema nervoso podem ocasionar déficits de aprendizagem e função motora, além de alterações de comportamento (COSTA et al., 2004; FALLUEL-MOREL et al., 2007; CARVALHO et al., 2008).

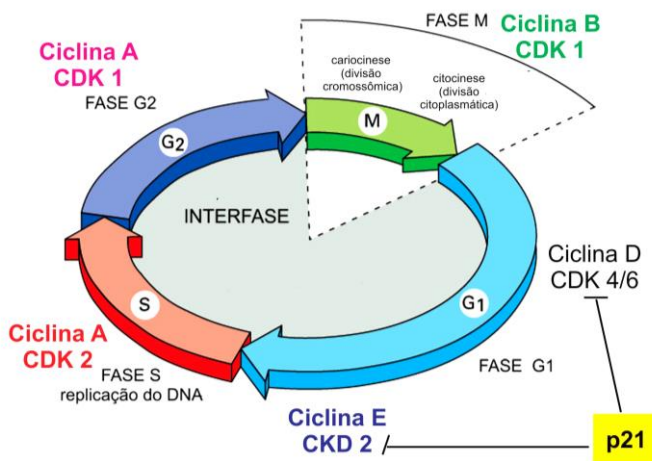


Figura 5. Representação esquemática do ciclo celular e algumas moléculas envolvidas com seu controle. Fonte: adaptado de Alberts et al. (2010).

Estudos *in vivo* e *in vitro* vêm mostrando que o MeHg interfere no mecanismo de proliferação celular em vários órgãos do SNC em

desenvolvimento, em diferentes espécies de vertebrados como anfíbios (HUYCK et al., 2015), peixes (HASSAN et al., 2011) e roedores (BURKE et al., 2006; FALLUEL-MOREL et al., 2007; XU et al., 2010), porém informações sobre seus mecanismos de atuação sobre o ciclo celular ainda são escassos.

Sabe-se que a integridade funcional dos microtúbulos no citoesqueleto é crítica para o desenvolvimento fisiológico do SN, envolvendo a proliferação celular e a migração de neurônios pós-mitóticos para formar as camadas do cérebro, cerebelo e medula (CASTOLDI et al., 2001; BONACKER et al., 2004; STOIBER et al., 2004). Dentre as proteínas do citoesqueleto, as tubulinas parecem ser um dos alvos do MeHg, em função da alta afinidade deste metal pelos grupos sulfidríla presentes nestas proteínas. Como mostram as análises realizadas em vários modelos celulares, como fibroblastos (SAGER; DOHERTY; OLMSTED, 1983; OCHI, 2002; THIER et al., 2003), glioma (MIURA; INOKAWA; IMURA, 1984), neurônios granulares cerebelares (CASTOLDI et al., 2000) e outras linhagens neurais (MIURA et al., 1999), na presença de MeHg as tubulinas ficam impossibilitadas de realizar suas atividades. A ligação do MeHg com as tubulinas parece impedir a polimerização e formação de microtúbulos (MT) (THIER et al., 2003), levar à despolimerização (SAGER; DOHERTY; OLMSTED, 1983; MIURA et al., 1999) e alterações no centróssomo, com formação de fibras anormais do fuso mitótico (OCHI, 2002), além de impedir a atividade de proteínas motoras (cinesina e dineínas) (THIER et al., 2003) e causar acúmulo de células na fase G2 (MIURA et al., 1999) e fase M (CRESPO LOPES et al., 2009), impedindo a proliferação celular.

Evidências indicam que parte da função genotóxica do mercúrio estaria relacionada a sua interferência na atividade normal das proteínas motoras e microtúbulos durante a formação do fuso mitótico. Esse processo geraria problemas na segregação dos cromossomos durante a mitose, impedindo a translocação cromossômica e, eventualmente, levando à formação de micronúcleos (BONACKER et al., 2004; CRESPO LOPES et al., 2009).

A apoptose é um mecanismo inerente ao desenvolvimento, necessária para que a organogênese ocorra adequadamente, sobretudo no SNC (DOSSEF, 2004). Este processo pode ser perturbado por disruptores como, por exemplo, o metilmercúrio. Análises histológicas em vários órgãos do SNC mostram morte celular por apoptose (ETO et al., 1999; HUYCK et al., 2015), indicando que o MeHg é uma substância tóxica tanto aos neurônios quanto às células gliais

(ASCHNER et al., 2000; BELLETTI et al., 2002; FARINA; ROCHA; ACHNER, 2012) e a excessiva morte de células durante os processos de neurogênese e de gliogênese podem levar a alterações na citoarquitetura do SN (CECCATELLI et al., 2010).

Linhagens celulares neurais, avaliadas *in vivo* e *in vitro* após exposição ao MeHg, sofrem alteração na expressão de moléculas relacionadas à apoptose, como as caspases 3, 7, 8 e 9 (FUJIMURA et al., 2009; SOLOWSKI et al., 2011; SHARPE et al., 2012; WATANABE et al., 2013), Bax, Bak (SOLOWSKI et al., 2011), Bcl2 (LU et al., 2011), além da liberação de citocromo C e síntese de AIF (fator inibidor de apoptose) (CECCATELLI et al., 2010). Esses dados sugerem que vias de sinalização apoptóticas são acionadas pela exposição à este organometal que, de acordo com a intensidade do insulto (dose e/ou tempo de exposição), pode causar a morte celular (CASTOLDI et al., 2000; FUJIMURA et al., 2009). A sinalização das vias apoptóticas pode ser iniciada por ação das espécies reativas de oxigênio (ROS) aumentadas em sistemas expostos a MeHg (FARINA et al., 2013).

1.5 MITOCÔNDRIA COMO ORGANELA ALVO DO MeHg

As mitocôndrias são organelas dinâmicas que desempenham papéis importantes em muitas atividades celulares, tais como a síntese de ATP, metabolismo e envelhecimento celular (ITOH et al., 2013) além de estarem envolvidas em várias vias de sinalização fundamentais para a vida e morte da célula (VERDE; KROEMER, 2004). Alterações na estrutura e função mitocondrial são observadas em sistemas expostos ao MeHg (POLUNAS et al., 2011; FARINA et al., 2011), sendo que esta organela é danificada pelo metal, apresentando, em análises de microscopia eletrônica, aumento de tamanho e número, edema entre as cristas mitocondriais e perda da integridade nas membranas interna e externa em tecidos neurais (GLASER et al., 2010). Uma outra forma de mercúrio, o cloreto de mercúrio (HgCl) parece causar danos às mitocôndrias de tecidos não neurais, levando ao desaparecimento das cristas, edema e formações vacuolares (CARRANZA-ROSALES et al., 2005; CHATTERJEE et al., 2014)

A ação do MeHg sobre a mitocôndria tem sido associada ao aumento no estresse oxidativo, onde há a superprodução de espécies reativas de oxigênio (MORI et al., 2007), causando danos à atividade das enzimas e ao DNA mitocondrial (SHARPE et al., 2012). Além disso, o MeHg potencializa a neurotoxicidade por atacar centros nucleofílicos de proteínas essenciais à função mitocondrial (USUKI et al., 2008;

FARINA et al., 2011). O MeHg provoca alterações na atividade das principais enzimas e complexos da cadeia respiratória (creatina kinase mitocondrial e complexos I e II) (MORI et al. 2007; GLASER et al., 2010) causando redução na síntese de ATP (BELLETTI et al., 2002; SHARPE et al., 2012). O estresse oxidativo também provoca aumento na mitofagia, perturbando a dinâmica mitocondrial de fissão e fusão e causando aparecimento de mitocôndrias com morfologias incomuns.

A autofagia ou macroautofagia é um termo geral para os processos pelos quais constituintes intracelulares, incluindo proteínas, agregados de proteínas e organelas, são envolvidos dentro de uma estrutura de dupla membrana (autofagossomo), sendo degradados mediante fusão do autofagossomo com o lisossomo. Os blocos de macromoléculas, são subsequentemente reciclados, utilizados para a produção de energia ou secretados (LEVINE et al., 2004).

A autofagia seletiva podendo atuar sobre algumas organelas, tais como peroxissomos (peroxofagia), retículo endoplasmático (reticulofagia), ribossomos (ribofagia), gotículas lipídicas (lipofagia) e mitocôndrias (mitofagia) (MACVICAR et al., 2013). A mitofagia é necessária para a manutenção de uma rede mitocondrial saudável, eliminando mitocôndrias velhas e danificadas (KOMATSU et al., 2005; EGAN et al., 2011). Para ilustrar este “controle de qualidade” um estudo de dinâmica mitocondrial em fibroblastos mostrou que uma em cada cinco mitocôndrias geradas é despolarizada e eliminada por mitofagia (TWIG et al., 2008). Além da mitofagia, as mitocôndrias têm vários outros mecanismos de controle de qualidade que podem ocorrer através da degradação, incluindo proteases intramitocondriais, degradação proteossomal e através de vesículas derivadas de mitocôndrias (KLIONSKY et al., 2007). Numerosos estudos têm investigado controle de qualidade mitocondrial e remoção de mitocôndrias danificadas, através de mitofagia, em estados associados ao estresse oxidativo (WOHLGEMUTH et al., 2014; CHATTERJEE et al., 2014), nos quais outras organelas citoplasmáticas parecem participar, por exemplo o retículo endoplasmático (RE) (MACVICAR et al., 2015). Túbulos do retículo endoplasmático parecem participar também dos processos de fissão mitocondrial, demarcando o local da divisão com a participação de DRP-1, uma proteína importante do processo de fissão mitocondrial (FRIEDMAN et al., 2011), além disso a mitofagia parece estar intimamente ligada aos processos de fissão e fusão mitocondrial (TWIG et al., 2008).

A formação de autofagossomos é coordenada por uma sequência de genes denominados ATG (*autophagy related genes*), os quais foram

primariamente descritos em leveduras e posteriormente em mamíferos (MEIJER et al., 2007). A ativação de morte autofágica em mamíferos envolve a molécula LC3 (*microtubule-associated protein light chain 3*), levando à fusão dos autofagossomos com os lisossomos. A fusão destas duas vesículas membranosas forma o autofagolisossomo, que possui dupla membrana, e as enzimas trazidas pelos lisossomos são responsáveis pela degradação do conteúdo autofágico. A morte celular autofágica possui alguns elementos comuns à via de sinalização apoptótica. No processo de morte autofágica, a proteína Beclina 1, que é a principal proteína na formação do autofagossomo em mamíferos, interage com proteínas anti-apoptóticas da família Bcl-2. Entretanto, a morte autofágica tem como característica morfológica a formação de inúmeros vacúolos celulares e, diferentemente da morte por apoptose, não há encolhimento celular, visto que as proteínas do citoesqueleto bem como o núcleo celular passam por desestruturação posteriormente. Além disso, este tipo de morte celular é característica de situações de exposição celular à privação de nutrientes e estresse terapêutico, entretanto, o acúmulo intracelular de cálcio e ROS podem conduzir a este tipo de morte celular (FULDA et al., 2010).

As mitocôndrias possuem uma versatilidade funcional que é acompanhada de complexidade morfológica (FREY e MANNELLA, 2000), sendo que ciclos repetitivos de fusão e fissão são fundamentais para dinâmica mitocondrial. As interações entre as mitocôndrias por fissão e fusão estabelecem tamanho, número e forma da organela, e permitem a mistura dos conteúdos mitocondriais, incluindo proteínas, lipídios e DNA. Os neurônios, por sua grande demanda energética, contêm muitas mitocôndrias tubulares, as quais são altamente ativas na movimentação e dinâmicas de fissão e fusão (FREDERICK; SHAW, 2007).

A fissão e a fusão mitocondrial são controladas por grupos de dinaminas – GTPases (OKAMOTO; SHAW, 2005; CAMPELLO; SCORRANO, 2010), entre elas destacam-se a DRP-1 (*Dynamin-related protein 1*), Mfn (*Mitofusin*) e OPA (*optic atrophy protein-1*) (OLICHON et al., 2003).

As mitocôndrias proliferam por crescimento e divisão e neste processo a DRP 1 (*Dynamin-related protein 1*) tem um papel importante. Esta é uma dinamina-GTPase citosólica (SMIRNOVA et al., 2001) que atua na regulação da fissão ou divisão mitocondrial em células de mamíferos. Esta proteína precisa ser ativada para induzir a fissão mitocondrial e sua participação nos processos de mitofagia tem sido associada à remoção das mitocôndrias não funcionais submetidas a

estresse oxidativo, garantindo o controle de qualidade mitocondrial (FRANK et al., 2012). A Fis (*mitochondrial fission 1 protein*) também tem demonstrado papel importante na fissão mitocondrial em mamíferos (YOON et al., 2003).

A Mfn1 (do inglês *mitofusin-1*) e a Mfn2 (do inglês *mitofusin-2*) são as principais reguladoras da fusão da membrana mitocondrial externa em mamíferos (SANTEL; FULLER, 2001), e OPA, importante para a fusão da membrana mitocondrial interna. A fusão mitocondrial é particularmente importante no sistema nervoso, ajudando os neurônios a atender à alta demanda de ATP para a função neuronal (KNOTT et al., 2008; RUGARLI et al., 2012) mantendo um nível adequado de capacidade bioenergética (CHEN; MCCAFFERY, CHAN, 2007).

A fusão mitocondrial também é um processo efetor de várias vias de sinalização e pode desempenhar um papel importante em patologias (WASILEWSKI; SCORRANO, 2009). Evidências experimentais indicam que mudanças na forma das mitocôndrias são essenciais para a manutenção da homeostase celular, em situações de aumento do estresse oxidativo (CEREGHETTI; SCORRANO, 2006). Essas organelas, por sua capacidade dinâmica, podem ajustar-se e a situações de estresse, alterando sua capacidade bioenergética ao modificarem sua forma.

As mitocôndrias podem apresentar morfologias na forma de redes mitocondriais, túbulos retos, vacúolos, formas encurvadas ou em cálice (*cup*) e formas de anéis (*donuts*). Mitocôndrias na forma *donut* são um sinal de estresse mitocondrial induzido por estresse oxidativo (BENARD; ROSSIGNOL, 2008; AHMAD et al., 2013). O aparecimento de formas dinâmicas incluindo a formação *donut* pode ser uma possível adaptação à situação de estresse, pois remodelando sua forma tubular reta para o formato *donut*, que é uma autofusão, a mitocôndria preserva seus componentes em condição de estresse metabólico (LIU; HAJNÓCZKY, 2011; HARA et al., 2014; LIONETTI et al., 2014). Estudos de situações que levam a estresse oxidativo celular vêm mostrando mudanças na dinâmica de fusão e fissão mitocondrial (YOULE; VAN DER BLIEK, 2012), bem como mudanças na forma das mitocôndrias sob estas condições.

1.6 EMBRIOTOXICIDADE POR METILMERCÚRIO

Vários estudos realizados em mamíferos mostram a neurotoxicidade do mercúrio durante o desenvolvimento. Entre os efeitos observados estão danos ao cerebelo (COSTA et al., 2004), alterações no sistema de defesa antioxidante (STRINGARI et al., 2008)

e disparidade motora (DIETRICH et al., 2005; FUJIMURA; CHENG; ZHAO, 2012). O mercúrio também parece ser tóxico aos embriões de aves de várias espécies, em diferentes condições experimentais, (HEINZ et al., 2006), sendo especialmente tóxico ao sistema nervoso (BERTOSSO et al., 2004), entretanto poucos trabalhos vêm utilizando este grupo animal como modelo experimental para estudos de embriotoxicidade.

Estudos realizados pela equipe do Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal (BEG/CCB/UFSC) mostraram que embriões de *G. domesticus* expostos ao MeHg no 5º dia embrionário (E5) e analisados logo após a eclosão, apresentaram menor capacidade de explorar ambientes e movimentos anormais de pernas e asas. Análises morfológicas mostraram impregnação de mercúrio nas 3 camadas teciduais do cerebelo, sendo que a camada granular apresentou a maior deposição. A camada de Purkinje foi a mais afetada pois, além de redução no número de neurônios, apresentou alteração na citoarquitetura pela maior distância entre as células. Adicionalmente, análises bioquímicas revelaram aumento significativo na atividade das enzimas relacionadas ao sistema de defesa antioxidante, glutathione peroxidase e glutathione reductase indicando estresse oxidativo (CARVALHO et al., 2008). Um outro estudo realizado pela mesma equipe utilizando acetato de chumbo, evidenciou respostas comportamentais e bioquímicas similares às dos embriões tratados com MeHg, como déficit motor e cognitivo; e alteração no sistema de defesa antioxidante no cerebelo de embriões tratados *in ovo* (MULLER et al., 2008). Análises realizadas na medula espinhal de embriões expostos ao acetato de chumbo evidenciaram que este órgão do SNC também é suscetível à ação de metais pesados. Neste estudo, Muller e colaboradores (2012) utilizando embriões de *G. domesticus* submetidos a exposição por acetato de chumbo (5º dia embrionário) observaram intensa impregnação do metal nas 3 camadas da medula espinhal (ependimal, manto e marginal) no 11º dia embrionário. Adicionalmente, análises imunohistoquímicas revelaram que as células da linhagem glial (marcadas com anti-GFAP) expressaram maior quantidade da proteína caspase-3 que as células da linhagem neuronal (marcadas com anti- β -tubulina-III). Estes dados mostram que a medula espinhal, também é um alvo da ação neurotóxica dos metais pesados, que neste estudo, induziram aumento da morte celular apoptótica na linhagem glial, o que além de prejudicar o desenvolvimento do SNC, pode comprometer as funções motoras no indivíduo em período pós-natal (MULLER et al., 2012).

1.7 JUSTIFICATIVA

A neurotoxicidade no desenvolvimento ainda não é totalmente compreendida, e a maioria dos estudos de embriotoxicidade por metilmercúrio é realizada em roedores e, muitos destes, *in vitro* ou em animais em período pós-natal (XU et al., 2010; FALLUEL MOREL ET AL., 2007; SOLOWSKI et al., 2011).

Poucos estudos utilizam a medula espinhal como modelo experimental, porém esta estrutura é um interessante modelo de estudo para SNC em desenvolvimento, pois além de ter relação com a função motora, altamente afetada por metais, assim como o cérebro e o cerebelo possui estrutura tecidual em camadas. Por ter sua estrutura tecidual menos complexa, a medula espinhal facilita os estudos de análises de toxicidade celular e molecular, pois vários mecanismos ocorrem durante o seu desenvolvimento e podem ser avaliados em camadas distintas.

O embrião de *G. domesticus* é um bom modelo para estudos de neurotoxicidade no desenvolvimento, pois além do seu rápido crescimento e grande similaridade do sistema nervoso desta espécie com outros vertebrados, a sua forma de desenvolvimento permite a administração de substâncias *in ovo*, com a incorporação do agente exógeno juntamente com os nutrientes do vitelo, sem a interferência do organismo materno.

Apesar de vários estudos *in vitro* já terem demonstrado a toxicidade do MeHg em linhagens neurais em desenvolvimento, estudos adicionais *in vivo* são necessários para complementar as informações acerca da neurotoxicidade. Além disso, há carência de informações mais detalhadas que esclareçam a ação do MeHg sobre mecanismos celulares como proliferação, morte e diferenciação do SNC. Buscando contribuir para maior compreensão dos mecanismos que envolvem a neurotoxicidade por metilmercúrio durante o desenvolvimento, seguem as hipóteses e objetivos propostos para este estudo.

1.8 HIPÓTESES

O MeHg, mesmo sendo administrado em dose única, interfere nos mecanismos celulares e causa alterações na medula espinhal de *Gallus domesticus* durante o seu desenvolvimento. Para tal propomos três hipóteses:

Na primeira hipótese deste estudo, propõe-se que o MeHg causa redução na proliferação celular nas camadas da medula espinhal, pela redução na expressão de ciclina E e aumento de expressão de p21.

A segunda hipótese proposta é a de que o MeHg causa alterações ultraestruturais nas células da medula espinhal, levando a morte celular.

A terceira e última hipótese é de que o MeHg causa redução no número de neurônios diferenciados.

II OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar os efeitos do MeHg sobre a ultraestrutura e os mecanismos moleculares e celulares envolvidos no desenvolvimento e organização das camadas da medula espinhal de embriões de *Gallus domesticus*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Investigar a interferência do tratamento com MeHg na citoarquitetura e na espessura das camadas da medula espinhal;
2. Analisar o efeito do MeHg sobre a proliferação das células da medula espinhal e sobre a expressão de proteínas relacionadas ao ciclo celular;
3. Avaliar o efeito do MeHg sobre organização ultraestrutural e sobre a indução da morte celular na medula espinhal;
4. Avaliar os efeitos do MeHg sobre a diferenciação neuronal na medula espinhal.

III MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAL DE ESTUDO

Ovos fertilizados de *Gallus domesticus* (n=50) doados pela Empresa Tyson do Brasil alimentos-LTDA, São José/SC foram transportados em bandejas de papelão, com acomodações individuais até laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal da UFSC onde foram higienizados, pesados em balança de precisão (100 - 0,01g) e identificados. A amostra consistiu de ovos homogêneos, de forma ovalada, coloração bege e peso médio de 66,66 g ($\pm 4,77$).

Os ovos foram mantidos em ambiente livre de luz direta, com oxigenação e umidade (50%) sob temperatura de 10-15°C, onde permaneceram em um período de repouso (mínimo 24 h) para adequada orientação de estruturas internas dos ovos, especialmente a calaza, pois estas podem ter movido durante o transporte. Transcorrido este período, os ovos foram colocados na incubadora (marca MIBO) a uma temperatura de 37.5°-38°C, umidade de 65% e oxigenação adequada (MAGALDI, 1974) em posição horizontal, de forma a expor a área mediana do ovo para cima, para posteriormente recortar uma pequena janela na casca para o acesso ao embrião (Fig. 6).

Considerando que os ovos fertilizados de embriões de galinha encontram-se no início da fase de gástrula no momento da postura, foi estabelecido um período de 2 h de incubação para que fosse retomado o processo de desenvolvimento. A partir deste momento foi adotado como critério de estagiamento o dia embrionário (E) sendo cada 24 h equivalente a 1 dia embrionário.

3.2 DEFINIÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

Para atingir aos objetivos propostos, foram constituídos 2 grupos experimentais, cada qual com n=25, totalizando 50 embriões. O tratamento foi desenvolvido conforme a descrição dos grupos abaixo:

- Grupo controle: 50 µl de solução salina NaCl 0,9% pH 7,4

- Grupo tratado com MeHg: 0,1 µg de ClMeHg (Sigma Aldrich) diluído em 50 µl de solução salina, concentração 2.0 µg / ml.

A dose utilizada neste projeto foi determinada a partir de estudos realizados em ave (HEINZ et al., 2009) e utilizado em trabalhos anteriores do grupo do Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal –UFSC (CARVALHO et al., 2008). O volume de 50 µl foi

baseado no trabalho de Heinz et al. (2006), que considerou o volume aproximado de 1 microlitro de solução administrado por grama de ovo.

O estágio E3 do desenvolvimento foi definido para o tratamento pois o tubo neural está completamente formado e as células do neuroepitélio estão em processo de proliferação e diferenciação para a estruturação das camadas da medula espinhal.

Os ovos em E3 (Fig. 6 a) foram retirados da incubadora na posição horizontal, e em ambiente asséptico, um orifício na região da câmara de ar foi perfurado com agulha e seringa para aspiração do albúmen (até 2,0 ml), com a finalidade de promover o descolamento da membrana interna na face mediana superior (onde está o embrião) e pela redução de volume promover a descida do embrião, evitando assim danificá-lo. Na face superior do ovo, foi recortada uma abertura (Fig. 6a, 6c) com diâmetro aproximado de 1 cm, com auxílio de tesoura fina e pinça. Após a observação do posicionamento do embrião seguiu-se à administração da solução conforme o grupo de tratamento. O tratamento foi realizado através de injeção da solução no saco vitelínico com auxílio de uma agulha hipodérmica ultrafina (8 mm x 0,30 mm) próximo à artéria vitelínica (Fig. 6 b) numa profundidade de até 1,0 mm com o auxílio de uma seringa (TAKAMATSU & FUJITA, 1987).

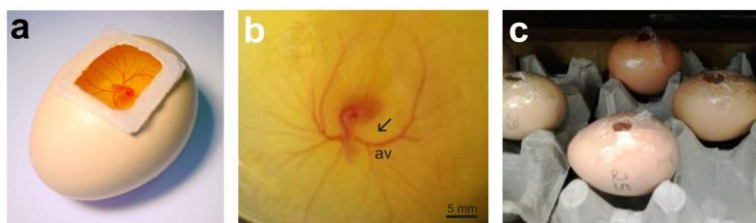


Figura 6. Manuseio de ovos e tratamento dos embriões de *Gallus domesticus* in ovo. Ovo de galinha no 3º dia de incubação, ilustrando perfuração lateral para retirada de clara e área marcada na região superior para recorte da janela na casca (quadro) (a). Embrião de galinha em estágio E3, no qual são realizados os tratamentos (b). A injeção do MeHg ocorre no saco vitelino (seta), próximo a artéria vitelínica (av). Ovos após os tratamentos, selados com fita adesiva (c) e reincubados até estágio E10. Fonte: Fotos obtidas pelo autor.

Após o tratamento os ovos foram então selados com fita adesiva não tóxica e devolvidos à incubadora até os embriões atingirem o estágio E10 (Fig. 3 e). A temperatura e a umidade da incubadora e o

desenvolvimento dos embriões foram diariamente acompanhados sendo removidos os ovos que apresentaram interrupção do desenvolvimento. Decorridos 7 dias após o tratamento os embriões foram dessensibilizados a 4°C por 15-20 min, removidos das membranas acessórias e avaliados quanto ao estágio de desenvolvimento (70x).

Testes iniciais utilizando administração do MeHg em embriões E1, posteriormente coletados e fixados em E3 e E5, demonstraram que este tempo de exposição não foi suficiente para incorporação do metal pelos tecidos animais (dados não mostrados), conforme observado por análises de autometalografia (AMG). Ajustando o tempo de exposição do MeHg *in ovo* para 7 dias, com maior consumo do vitelo contendo MeHg, confirmamos incorporação do metal pela identificação de células AMG positivas na medula espinhal de E10.

Um total de 50 ovos embrionados distribuídos em 5 incubações independentes foram utilizados neste estudo, gerando com um total de 44 embriões sobreviventes. Estes embriões foram utilizados nas técnicas microscopia de luz (24 embriões, 12 por grupo), citometria de fluxo (14 embriões, 7 por grupo) e microscopia eletrônica de transmissão (MET) (6 embriões, 3 por grupo).

Todos os procedimentos de incubação, tratamento e processamento dos embriões para as diversas técnicas utilizadas neste estudo (microscopia de luz, microscopia eletrônica, citometria de fluxo) foram desenvolvidos no Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal - Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética (BEG) – Centro de Ciências Biológicas (CCB) - UFSC. Os procedimentos utilizados neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais – UFSC, protocolo 355/CEUA e 23080.025620/2009-51/UFSC.

3.3 PROCESSAMENTO PARA MICROSCOPIA DE LUZ

Embriões em estágio E10 foram fixados em formaldeído a 4% por 48 h, mantidos em etanol a 70%, posteriormente pesados em balança analítica (100 - 0,1 mg) e avaliados quanto à morfologia geral. A medula espinhal da região truncal (somito 20-27) (LE DOUARIN et al., 2004) foi dissecada, desidratada em série crescente de etanol 70 - 100%, diafanizada em xilol e incluída em parafina. Secções transversais (6 µm) foram obtidas em micrótomo rotativo CUT 4055 Olympus e dispostos em lâminas histológicas preparadas com poly-L lisina a 10% ou gelatina 0,5%. As secções transversais de medula espinhal de embriões dos grupos controle e tratado foram distribuídas na mesma lâmina, sendo

submetidas às mesmas condições para o processamento das técnicas de microscopia de luz.

Secções tratadas para microscopia de luz foram analisadas e as imagens, capturadas em microscópio de epifluorescência Nikon Eclipse 80i acoplado a câmera Nikon Digital SIGHT DS Fi2

3.3.1 Análise morfológica e morfométrica da medula espinhal

A organização tecidual da medula espinhal como morfologia e distribuição das células e constituição das camadas endependimária, manto e marginal foram avaliadas a partir de secções transversais coradas com hematoxilina–eosina (HE) (40 - 200x). As secções da medula espinhal foram avaliados morfometricamente com auxílio de uma ocular micrométrica (200x). A morfometria foi realizada pela medida lateral de uma das faces da medula espinhal, sendo obtida a espessura total e a espessura de cada camada (Fig. 7).

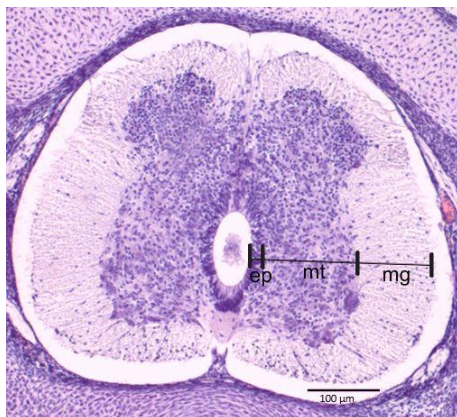


Figura 7. Análise morfométrica da medula espinhal. A barra horizontal indica o nível da secção transversal utilizada para obtenção dos dados morfométricos. As barras longitudinais indicam os limites entre as camadas da medula espinhal, endependimária (ep), manto (mt) e marginal (mg) adotados na análise morfométrica. Coloração: HE.

3.3.2 Autometalografia de TIMM (AMG)

A deposição de mercúrio nas camadas da medula espinhal foi avaliada pelo método de autometalografia (AMG), em que as secções foram desparafinizadas e imersas na solução de revelação AMG (60%

goma arábica, 10% tampão citrato de potássio, 30% de hidroquinona e 0,5% de nitrato de prata) na ausência de luz durante 60 min. Em seguida, as secções foram lavadas com água corrente e contrastadas com hematoxilina de Harris. A deposição de mercúrio foi avaliada como a presença de grânulos marrons na medula espinhal, que representam a deposição da prata em torno das partículas de mercúrio (DANSCHER, 1981). Esta deposição foi classificada como ausente (-), leve (+), moderada (++) e intensa (+++) de acordo com MÜLLER et al. (2012).

3.3.3 Marcações celulares por imunohistoquímica

Para avaliar o efeito do MeHg sobre a proliferação, ciclo celular e diferenciação da linhagem neural foi realizada a técnica de imunohistoquímica utilizando os anticorpos anti - fosfohistona H3 (pHH3-ser10) (marcador de mitose) (1:250), anti - ciclina E (1:100), anti - p21 (1:80), anti - γ -H2A.X (marcador de dano ao DNA) (1:50), e anti - β tubulina III (marcador neuronal) (1:100) (quadro 1). Para tal, as secções de medula espinhal foram desparafinizadas, reidratadas em série decrescente de etanol e o bloqueio de peroxidases endógenas realizado em solução metanol: peróxido de hidrogênio (4:1) seguida por banhos em PBS 0,1 M (do inglês *phosphate buffered saline*) pH 7.4. A permeabilização das membranas foi realizada em PBS + Triton X-100 a 0,3% e os sítios inespecíficos inativados em solução de soro fetal bovino (do inglês *fetal bovine serum*) a 5% em PBS + Triton X-100 a 0,1%. Em seguida procedeu-se a incubação com anticorpos primários (quadro 1) *overnight* a 4°C em câmara úmida. Em etapa seguinte, as secções foram lavadas com PBS + Triton X-100 a 0,1%, incubadas com os anticorpos secundários (quadro 2) por 3-4 horas a temperatura ambiente e lavados em PBS. Secções imunomarcadas com anticorpos fluorescentes foram montadas com meio de montagem aquoso- Gelmount® (Sigma) contendo DAPI (4,6-diamidina-2-fenilindol®).

Secções imunomarcadas com anticorpos secundários (quadro 1) contendo a enzima peroxidase, após lavados em PBS, foram tratadas com solução contendo 3,3- diaminobenzidina (DAB) e H₂O₂ (1mg de DAB e 5 μ l de H₂O₂ para cada ml de solução), desidratados e montados com resina Entellan®.

Para quantificar imunomarcações γ -H2A.X-positivas, a densidade integrada de pixels das imagens digitais fluorescentes foram determinadas com o *software Image J. (NIH Image)*. A barra de escala foi padronizada, e a densidade integrada de pixels foi obtida a partir de um quadro de 3.599,77 μ m².

A análise quantitativa para imunohistoquímica fosfohistona H3 (pHH3) e o teste de TUNEL (item 3.3.4) foi realizada por meio da contagem direta do número total de células positivas em cada camada da medula espinhal (X 200; Olympus, EUA) da face direita da medula espinhal.

Quadro 1. Anticorpos primários e secundários utilizados para as técnicas de imunohistoquímica

Anticorpos Primários	Localização da proteína	Diluição	Anticorpos secundários	Diluição
Anti-fosfohistona H3 IgG (policlonal, Upstate)	Nuclear	1:250	Anti-coelho conjugado à peroxidase (Sigma)	1:400
Anti-ciclina E IgG (policlonal, Santa Cruz)	Nuclear	1:50	Anti-coelho biotinilado e conjugado à peroxidase (Sigma)	1:100
Anti-p21 IgG (monoclonal, Santa Cruz)	Nuclear	1:80	Anti-camundongo biotinilado e conjugado à peroxidase (Sigma)	1:100
Anti- γ -H2A.X IgG (policlonal Santa Cruz)	Nuclear	1:50	Anti-camundongo Alexa Fluor® 633 (Molecular Probes)	1:100
Anti- β -tubulina III IgG (monoclonal, Promega)	Citoplasmática	1:100	Anti-camundongo Alexa Fluor® 488 (Molecular Probes)	1:200

3.3.4 Ensaio de TUNEL

Para identificar células em apoptose utilizamos o Kit TDT-Fragel DNA (TUNEL) (Calbiochem, EUA), que localiza terminações em fitas

de DNA fragmentado. As secções desparafinizadas da medula espinhal foram submetidas a reação de acordo com as instruções do fabricante. As células apoptóticas foram identificadas por exibirem precipitados marrom-escuros em seus núcleos.

3.4 ANÁLISE POR CITOMETRIA DE FLUXO

Medulas espinhais E10 não fixadas, foram dissecadas homogeneizadas e submetidas a lavagens consecutivas com PBS 0,1 M pH 7,8 (4°C). Em seguida, as células foram dissociadas utilizando 0,25% de tripsina durante 15 min a 37 ° C e em seguida acrescido de BSA a 5% sob agitação. Subsequentemente, as amostras foram centrifugadas a 640 x g durante 10 min, o sobrenadante foi recolhido, acrescido de PBS contendo Triton X-100 a 0,1% e distribuído em tubos separados para incubação com anticorpos primários (quadro 2).

Quadro 2. Anticorpos primários e secundários utilizados para as técnicas de citometria de fluxo.

Anticorpos Primários	Diluição	Anticorpos Secundários	Diluição
Anti-ciclina E IgG (policlonal, Santa Cruz)	1:1000	Anti-coelho Alexa Fluor® 568 (Molecular Probes)	1:1000
Anti-p21 IgG (monoclonal, Santa Cruz)	1:1000	Anti-camundongo Alexa Fluor® 488 (Molecular Probes)	1:1000
Anti- β -tubulina III IgG (monoclonal, Promega)	1:1000	Anti-camundongo Alexa Fluor® 488 (Molecular Probes)	1:1000

Foram adicionados aos tubos contendo o sobrenadante (300-500 μ l cada tubo) os anticorpos primários anti-ciclina E, anti-p21, anti- β -tubulina III (todos 1: 1000) e incubados durante 1 h em ambiente refrigerado. Em seguida, foram adicionados os anticorpos secundários (quadro 2) Alexa Fluor 568® (anti-IgG de coelho) e Alexa Fluor 488® (anti-IgG de camundongo) todos na concentração 1:1000, em incubação por 45 min protegida de luz. A leitura das amostras e coleta dos dados foi realizada no citômetro de fluxo FACSCanto II (BD Biosciences, Canadá) do Laboratório Multiusuários (LAMEB) do Centro de Ciências Biológicas da UFSC. As análises foram realizadas separadamente para

cada anticorpo em cada tratamento. Anteriormente, uma corrida com células não marcadas (“tubo branco”) foi realizada para determinar o “gate” ou “campo” com a população de células de interesse. Além disso, iodeto de propídio foi utilizado para refinar os “gates” de interesse.

Assim, a partir do diagrama *dotplot* contendo 20.000 eventos e considerando parâmetros de complexidade celular (SSC-A) e tamanho celular (FSC-A), foram determinadas “gates” com 1.800 eventos. Os valores foram apresentados em contagem absoluta. Os dados foram processados e analisados no *software* livre Flowing® 3ª edição.

3.5 ANÁLISE POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

Amostras de medula espinhal de aproximadamente 5 mm foram fixadas em solução contendo 2.5 % de glutaraldeído e 4% de paraformaldeído em tampão cacodilato de sódio 0.1 M (pH 7.2) *overnight* a 4°C. As amostras foram pós fixadas em solução tetróxido de ósmio 1% durante 4 h, desidratados em série crescente de soluções aquosas de acetona e infiltrados em resina Spurr (Spurr, 1969).

Secções semifinas de 700 nm foram coradas com azul de toluidina 1% (pH 4.8%) e analisadas, e a área a ser seccionada com espessura ultrafina foi delimitada. As secções ultrafinas de 60-90 nm foram contrastadas em solução aquosa de acetato de uranila a 5% e posteriormente em solução aquosa de citrato de chumbo a 1%. A secções foram analisadas e as imagens capturadas em Microscópio Eletrônico de Transmissão modelo JEOL (JEM) 1011 - (JEOL Ltd., Tokyo, Japão, a 80 kV) do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da UFSC.

As eletromicrografias dos grupos controle e tratado com MeHg foram analisadas em várias ampliações (de 4.000 a 100.000 x), identificando os compartimentos celulares e a sua ultraestrutura, comparando-se as diferenças entre os grupos. Após uma avaliação geral foram mais detalhadamente analisadas as organelas: mitocôndrias, retículo endoplasmático rugoso, corpos de Golgi e inclusões citoplasmáticas (tipo vacuolares) por estas apresentarem diferença aparente entre os grupos controle e tratado com MeHg.

As mitocôndrias, em função de sua grande quantidade, também foram avaliadas quantitativamente na ampliação 20.000x. Para a obtenção dos dados quantitativos foram analisadas 30 eletromicrografias por grupo (5 eletromicrografias por grid / 2 grids por embrião/ 3

embriões por grupo). As eletromicrografias para análise quantitativa foram obtidas pela tomada de imagens a partir de campos sequenciais não repetidos. Para a quantificação, foi utilizada a contagem direta, considerando-se todas as mitocôndrias presentes no campo. Apenas a camada do manto foi utilizada para a quantificação, pois as demais camadas não apresentaram variações significativas na morfologia mitocondrial.

As mitocôndrias foram analisadas e quantificadas com relação a: número total de mitocôndrias, número total de mitocôndrias com morfologia “normal”; número total de mitocôndrias com morfologia “alterada” (com rupturas nas membranas, dilatações ou alterações nas cristas, variações na morfologia tubular como os formatos “*donut*” e “*cup*”). A dinâmica mitocondrial também foi avaliada por quantificação do número total de mitocôndrias com perfil de fusão ou fissão (aspecto de halteres).

Os dados quantitativos do número de mitocôndrias (normal ou alterada; em fusão ou em fissão) foram calculados e organizados como média \pm erro padrão, onde cada eletromicrografia foi considerada um “n” amostral. Dados de percentagem a partir do número total de mitocôndrias nas 30 eletromicrografias também foi calculada para cada categoria de mitocôndria analisada: normal, alteradas, com perfil de fusão ou de fissão.

3.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados quantitativos foram apresentados como média (\pm erro padrão) e submetidos a teste t de *Student* não pareado ($p \leq 0,05$) verificando a significância nas diferenças entre os grupos controle e tratado com MeHg.

Para realização das análises estatísticas acima descritas, foram utilizados os programas GraphPad Prisma® versão 5.0 e Statistica® versão 10.

IV RESULTADOS

Embrões de *Gallus domesticus* tratados em E3 com MeHg e analisados após 7 dias, mostraram que houve incorporação deste organometal e deposição na medula espinhal. Além disso, as análises realizadas comprovaram que uma única dose de MeHg (0,1µg) ocasionou alterações morfométricas e ultraestruturais na medula espinhal, sem contudo alterar a sua morfologia geral. A expressão de proteínas relacionadas ao ciclo celular e o equilíbrio entre proliferação e morte celular também parecem ser perturbados pela ação do MeHg.

Do total de ovos destinados a este estudo (50) ovos, 44 prosseguiram seu desenvolvimento após o tratamento *in ovo*, sendo monitorados até o 10º dia de incubação. Seis embriões morreram após o tratamento, 3 do grupo tratado com MeHg e 3 do grupo controle, alguns deles apresentavam anomalias congênitas comuns em embriões de aves. No grupo controle foram identificados um embrião (E6) que apresentava abertura na parede ventral do corpo e outro embrião (E4) com exocardia. O terceiro embrião do grupo controle (E9) não apresentou alterações morfológicas externas. No grupo tratado com MeHg apenas um embrião (E9) apresentou defeitos de face e ausência de membros posteriores, os outros embriões (E6 e E7) não apresentaram anomalias congênitas aparentes. Defeitos de tubo neural (DTNs) como espinhas bífidas (oculta, cística ou com mielosquise) e anencefalia, não foram observados em nenhum dos embriões de ambos os grupos analisados, conforme o esperado, considerando a idade analisada.

Os embriões dos grupos controle e tratado com MeHg que atingiram E10 (22 por grupo) apresentaram características morfológicas normais para a idade e foram utilizados para as diversas análises propostas neste estudo.

A avaliação morfométrica mostrou que os embriões tratados com MeHg apresentaram peso total (2.45 ± 0.28 g) significativamente menores que nos embriões do grupo controle (3.62 ± 0.10 g, $p \leq 0.001$) (Fig. 8).

A deposição de mercúrio foi evidenciada na medula espinhal de embriões E10 tratados com MeHg, nas três camadas da medula espinhal, sendo observada maior deposição nas camadas endodimal e do manto (Fig. 9). Foram observados grânulos de coloração marrom, indicando a presença do mercúrio no interior das células da medula espinhal de embriões tratados com MeHg. A figura 9 apresenta um esquema quantitativo da impregnação por mercúrio nas camadas da medula espinhal mostrando áreas com maior ou menor deposição. Estes dados

mostram que o tempo de exposição utilizado neste estudo (7 dias) foi suficiente para a incorporação do MeHg pelo embrião e deposição nos tecidos embrionários, entre eles o nervoso.

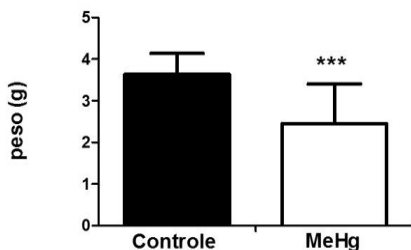


Figura 8. Peso total dos embriões E10 dos grupos controle e tratado com MeHg. Média de peso de embriões dos grupos controle (3.69 ± 0.10 g) e tratado com MeHg (2.45 ± 0.28 g, *** $p < 0.001$). $n = 12$ embriões por grupo. Dados expressos como média \pm erro padrão.

4.1 A INTERFERÊNCIA DO MeHg NA ESPESSURA DAS CAMADAS DA MEDULA ESPINHAL

A medula espinhal de embriões de ambos os grupos analisados apresentaram o canal ependimal central, revestido pela camada ependimal, seguida pela camada do manto e marginal, estando a medula totalmente envolvida pelo tecido conjuntivo. A distribuição das células e organização das camadas na medula espinhal dos embriões em E10, foi semelhante entre os grupos analisados (Fig. 10). No entanto análises morfométricas revelaram diferenças significativas entre os grupos controle e tratado com MeHg.

Embriões do grupo tratado com MeHg apresentaram menor espessura total da medula espinhal ($284.80 \pm 9.13 \mu\text{m}$), quando comparado ao grupo controle ($394.87 \pm 35.6 \mu\text{m}$, $p < 0.05$) (Fig. 10 c). Ao avaliar separadamente cada camada da medula espinhal, observou-se que a espessura da camada ependimal não difere entre os grupos tratado com MeHg e controle ($p > 0.05$) (Fig. 10c). Por outro lado, as camadas do manto ($p < 0.01$) e marginal ($p < 0.05$) do grupo exposto ao MeHg apresentaram redução significativa nas respectivas espessuras (tabela 1; Fig. 10 d).

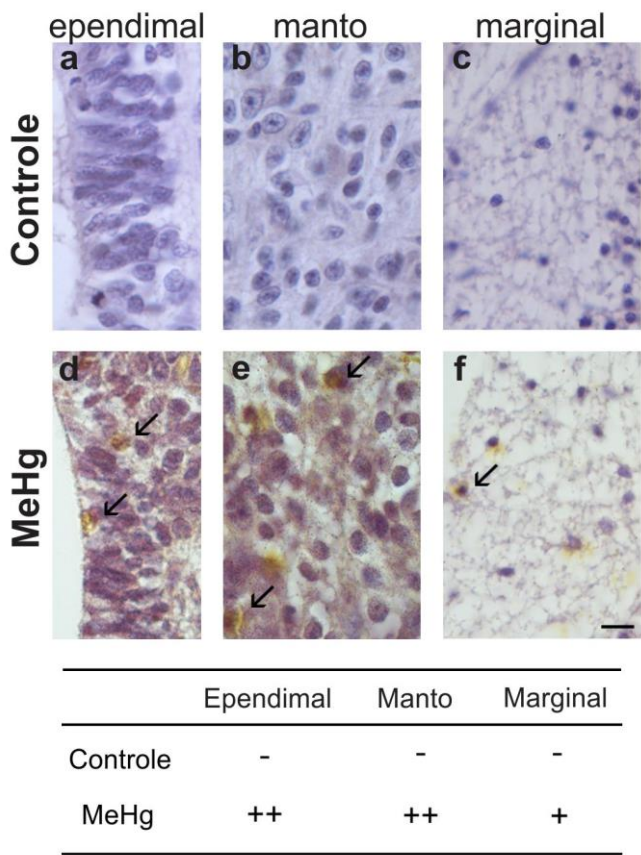


Figura 9. Deposição de mercúrio na medula espinhal de embriões em E10 Secções transversais de embriões controle (a – c) e tratados com MeHg (d – f), evidenciando a deposição de mercúrio (setas). O quadro em anexo mostra a intensidade de deposição de mercúrio nas camadas da medula espinhal, classificada como ausente (-), leve (+) e moderada (++). Técnica de Autometalografia de Timm (AMG). Contra - coloração: Hematoxilina. Barra de escala: 10µm. n = 3 embriões por grupo/ 3 secções por embrião (obtidos a partir de 2 experimentos independentes).

Tabela 1- Efeito do MeHg sobre a espessura das camadas da medula espinhal. Valores (µm) expressos como média ± erro padrão (n = 7 embriões por grupo). * p < 0.05 e ** p < 0.01

Camada	Grupo Controle	Grupo MeHg
Ependimal	18.94 (± 1.14)	20.77 (± 0.38)
Manto	248.19 (± 21.48)	172.01 (± 7.41) **
Marginal	127.74 (± 14.74)	92.03 (± 4.12) *

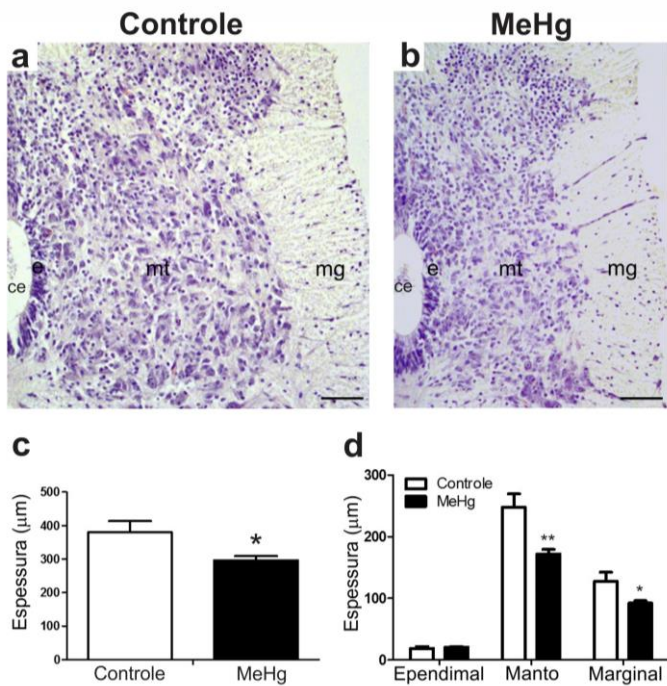


Figura 10. Espessura das camadas da medula espinhal de embriões em E10. Embrião controle (a) e embrião tratado com MeHg (b) ilustrando diferença na espessura da medula espinhal. Nas figuras (a - b) são visíveis o canal ependimal (ce), a camada ependimal (e), a camada do manto (mt) e a camada marginal (mg). O gráfico (c) ilustra o efeito do tratamento com MeHg na espessura total da medula espinhal e o gráfico (d) ilustra a espessura de cada uma das camadas. Os dados são expressos como média ± erro padrão. * p < 0.05 e ** p < 0.01. Coloração HE. Barra de escala: 50 µm. n = 7 embriões por grupo/3 secções por embrião obtidos a partir de 3 experimentos independentes.

4.2 EFEITO DO MeHg SOBRE A PROLIFERAÇÃO E CICLO CELULAR

Tendo em vista que a proliferação é um mecanismo celular básico para o desenvolvimento das estruturas e órgãos, e que a interferência neste mecanismo poderia justificar a redução na espessura das camadas da medula espinhal observada nos embriões tratados com MeHg, avaliou-se o efeito desse metal na proliferação e no ciclo celular dos embriões após o tratamento com MeHg.

Células em proliferação, marcadas com anticorpo anti-fosfohistona H3 (pHH3), foram observadas em ambos os grupos analisados, distribuídas por toda a medula espinhal, sendo menos numerosas nos embriões tratados com MeHg (Fig. 11).

Analisando individualmente cada camada, observou-se que no grupo tratado com MeHg a camada ependimal apresentou menor número de células em proliferação (0.20 ± 0.11) que o grupo controle (0.93 ± 0.28 , $p < 0.05$), o que também foi observado na camada do manto (grupo tratado com MeHg: 0.33 ± 0.13 ; grupo controle: 1.07 ± 0.27 , $p < 0.05$). A camada marginal do grupo tratado com MeHg apresentou uma tendência à redução no número de células pHH3-positivas (0.20 ± 0.11), porém esta redução não foi significativa em relação ao grupo controle (0.80 ± 0.28) (Fig. 11 b).

Para compreender melhor os mecanismos relacionados à redução na proliferação celular da medula espinhal de embriões tratados com MeHg, foi realizada a investigação da expressão de proteínas que auxiliam no controle do ciclo celular, a p21 e a ciclina E (Fig. 12).

Análises imunohistoquímicas mostraram que células p21 e ciclina E - positivas foram observadas em todas as camadas da medula espinhal em ambos os grupos analisados (Fig. 12 e Fig. 13). O aumento no número de células p21-positivas foi observado nos embriões tratados com MeHg, principalmente nas camadas ependimal e do manto, quando comparado ao grupo controle (Fig. 12 a - f). As células p21-positivas nos embriões tratados com MeHg também apresentaram maior intensidade de marcação do que as células dos embriões controle (Fig. 12 d - f). Dados obtidos por citometria de fluxo mostraram resultados similares aos obtidos por imunohistoquímica, com número significativamente maior de células p21-positivas em embriões tratados com MeHg (473.33 ± 62.40), comparado aos embriões do grupo controle (100.67 ± 17.47 , $p < 0.05$) (Fig. 12 h).

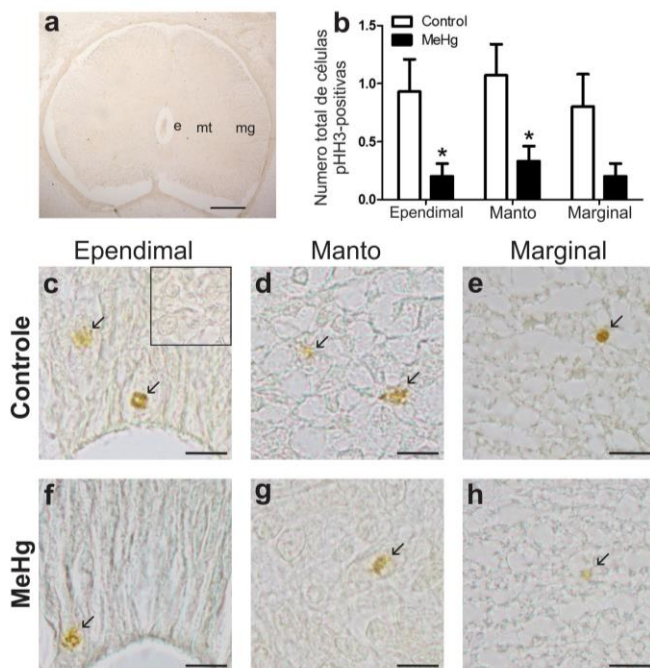


Figura 11. Efeito do MeHg sobre a proliferação celular nas camadas da medula espinhal de embriões em E10. Vista total de secção transversal, destacando as camadas endodimal (e), do manto (mt) e marginal (mg) (a). Gráfico ilustrando o número total de células pHH3-positivas nas camadas da medula espinhal (b). Imunohistoquímica mostrando células fosfohistona-H3-positivas (setas) em embriões controle (c – e) e em embriões tratados com MeHg (f – h). O inserto em c representa o controle negativo da reação imunohistoquímica. Os dados estão representados como média ± erro padrão. * Indica $p < 0.05$. Barra de escala em a: 100µm. b - h: 10 µm. n = 4 embriões / 3 secções por embrião (obtidos a partir de 3 experimentos independentes).

Com relação às análises para ciclina E, uma proteína importante para a progressão do ciclo celular, os embriões tratados com MeHg apresentaram leve redução no número de células ciclina E-positivas, as quais apresentavam menor intensidade de marcação (Fig. 13 a - f). Entretanto, a avaliação por citometria de fluxo mostrou que a expressão de ciclina E não foi alterada significativamente no grupo tratado com MeHg (102.7 ± 15.2), quando comparado ao grupo controle (145.0 ± 55.28), (Fig. 13 h).

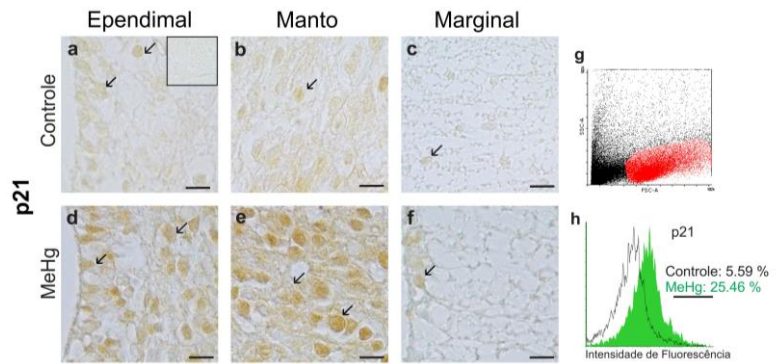


Figura 12. Expressão da proteína p21 na medula espinal de embriões em E10. Embriões controle (a - c) e tratados com MeHg (d - f) apresentando células p21-positivas (setas). O inserto em (a) representa controle negativo da reação imunohistoquímica. O dotplot (g) ilustra a região selecionada para análises por citometria de fluxo. O gráfico (h) mostra o perfil de expressão e frequência relativa de células p21-positivas em embriões controle e tratados com MeHg. n total = 6 embriões por grupo obtidos a partir de 3 experimentos independentes. Barra de escala- a - f: 10 μ m.

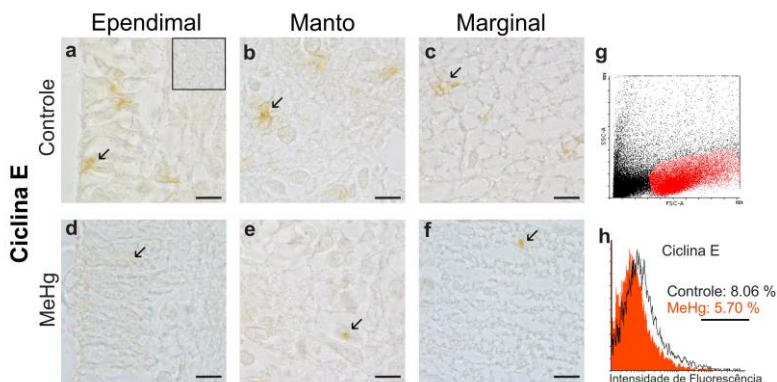


Figura 13. Expressão da proteína ciclina E na medula espinal de embriões em E10. Embriões controle (a - c) e tratados com MeHg (d - f) apresentando células Ciclina E-positivas (setas). O inserto em (a) representa controle negativo da reação imunohistoquímica. O dotplot (g) ilustra a região selecionada para análises por citometria de fluxo. O gráfico (h) mostra o perfil de expressão e frequência relativa de células ciclina E-positivas em embriões controle e tratados com MeHg. n total = 6 embriões por grupo obtidos a partir de 3 experimentos independentes. Barra de escala- a - f: 10 μ m.

4.3. EFEITO GENOTÓXICO DO MeHg SOBRE A MEDULA ESPINHAL

Os resultados das análises por imunofluorescência revelaram que MeHg induziu um aumento da expressão de γ -H2A.X ($53740.89 \pm 7834.14 \mu\text{m}^2$), quando comparado com os embriões controle ($34473.89 \pm 670.97 \mu\text{m}^2$, $p < 0.05$) (Fig. 14 g). A expressão da proteína γ -H2A.X ocorre em resposta à ruptura das fitas de DNA, assim, a sua expressão indica dano ao DNA. Em embriões tratados com MeHg, as células γ -H2A.X-positivas foram encontradas na zona de transição entre as camadas endepidural e do manto (Fig. 14 e).

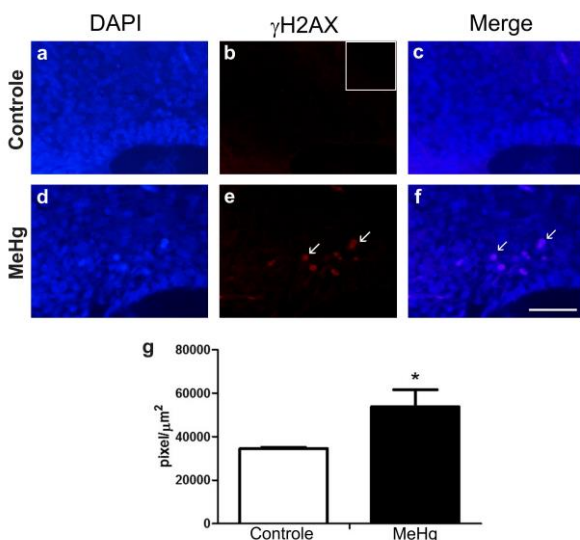


Figura 14. Dano ao DNA na medula espinhal em embrião em E10. Secções transversais de medula espinhal de embriões controle (a - c) e embriões tratados com MeHg (d - f) marcados com anti- γ H2A.X. Células γ H2A.X-positivas (setas) foram observadas na região de transição entre as camadas endepidural e do manto de embriões tratados com MeHg. O inserto em b representa controle negativo da reação imunohistoquímica. Os núcleos celulares foram evidenciados com DAPI. Sobreposição de imagens (merge) dos embriões controle (a - b) e tratados com MeHg (d - f). O gráfico (g) mostra o perfil de expressão de γ -H2A.X na medula espinhal de embriões controle e tratados com MeHg. A densidade integrada de pixels na fluorescência de γ -H2A.X foi determinada por software *Image J.*, e os dados expressos como média \pm erro padrão. * Indica $p < 0.05$. Barra de escala: 10 μm . Inserto em b: 5 μm . $n = 3$ embriões por grupo / 2 secções por embrião (obtidos a partir de 2 experimentos independentes).

4.4 EFEITO DO MeHg SOBRE A MORTE CELULAR

A morte celular é um outro mecanismo celular básico e importante para o desenvolvimento, de modo que buscamos identificar se, além de interferir na proliferação celular e causar dano ao DNA, a dose aqui utilizada ($0,1\mu\text{g}/50\mu\text{l}$), estaria interferindo no mecanismo de morte celular.

Células em processo de morte foram identificadas nas camadas do manto e marginal na medula espinhal dos embriões controle e tratados com MeHg. Entretanto maior número de células TUNEL-positivas foi encontrado em embriões do grupo tratado com MeHg (Fig. 15).

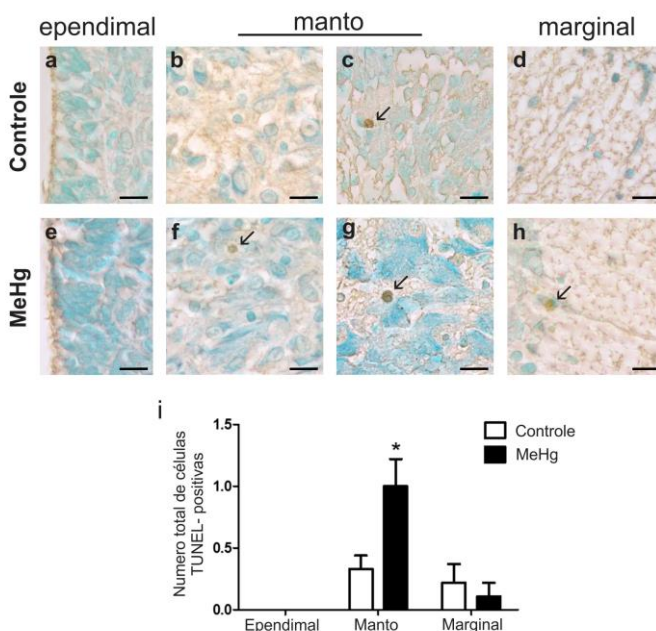


Figura 15. Morte celular na medula espinhal de embriões em E10. Secções transversais de embriões E10 controle (a – d) e tratados com MeHg (e – h), analisados pelo método de TUNEL. Células em processo de morte (setas). Gráfico (i) mostra o número total de células TUNEL-positivas nas camadas da medula espinhal. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão. * Indica $p < 0.05$. Barra de escala: $10\mu\text{m}$. $n = 4$ embriões por grupo /3 secções por embrião (obtidos a partir de 3 experimentos independentes).

Avaliando quantitativamente o número de células TUNEL-positivas em cada camada da medula espinhal, identificou-se diferença significativa na camada do manto, ao comparar embriões dos grupos controle (0.33 ± 0.21) e tratados com MeHg (1.00 ± 0.22 , $p < 0.05$) (Fig. 15 b - c, f - g, i). O número de células marcadas na camada marginal não apresentou diferença significativa entre os grupos controle (0.10 ± 0.10) e tratados com MeHg (0.17 ± 0.17) (Fig. 15 d, h, i). Nenhuma célula TUNEL-positiva foi encontrada na camada endodimal nos grupos analisados (Fig. 15 a, e).

4.5 ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DA MEDULA ESPINHAL

A presença de mercúrio nas células da medula espinhal não alterou a sua citoarquitetura, porém ultraestruturalmente causou alterações em algumas organelas, como os corpos de Golgi (CG), retículo endoplasmático rugoso (RER) mitocôndrias. Grande número de inclusões citoplasmáticas com membranas concêntricas, mitofagia e células em processo de morte celular, com características de morte autofágica, também foram identificados na camada do manto de embriões tratados com MeHg, diferente do observado nos embriões do grupo controle. As células das camadas endodimal e marginal não apresentaram diferenças ultraestruturais entre embriões controle e tratados com MeHg, razão pela qual apresentaremos apenas as informações referentes a camada do manto (Fig. 16).

Embriões tratados com MeHg apresentaram células com cisternas dos corpos de Golgi (CG) dilatadas, quando comparadas às células dos embriões controle (Fig. 16 a - b). O retículo endoplasmático rugoso apresentou-se com cisternas dispersas e levemente dilatadas na medula espinhal de embriões expostos a MeHg (Fig. 16 d), diferentemente dos embriões controle que apresentaram cisternas do RER organizadas de forma paralela (Fig. 16 c). Inclusões citoplasmáticas com formações membranosas concêntricas foram identificadas em células de vários embriões tratados com MeHg (Fig. 16 e - g), o que não foi observado na medula espinhal dos embriões controle. Algumas vesículas membranosas (Fig. 16 d - e) foram observadas muito próximas dessas estruturas.

As mitocôndrias presentes nas células da medula espinhal de embriões controle apresentaram morfologia tubular reta (Fig. 17 a) com membranas interna e externa e cristas mitocondriais íntegras e bem organizadas (Fig. 17 b - c).

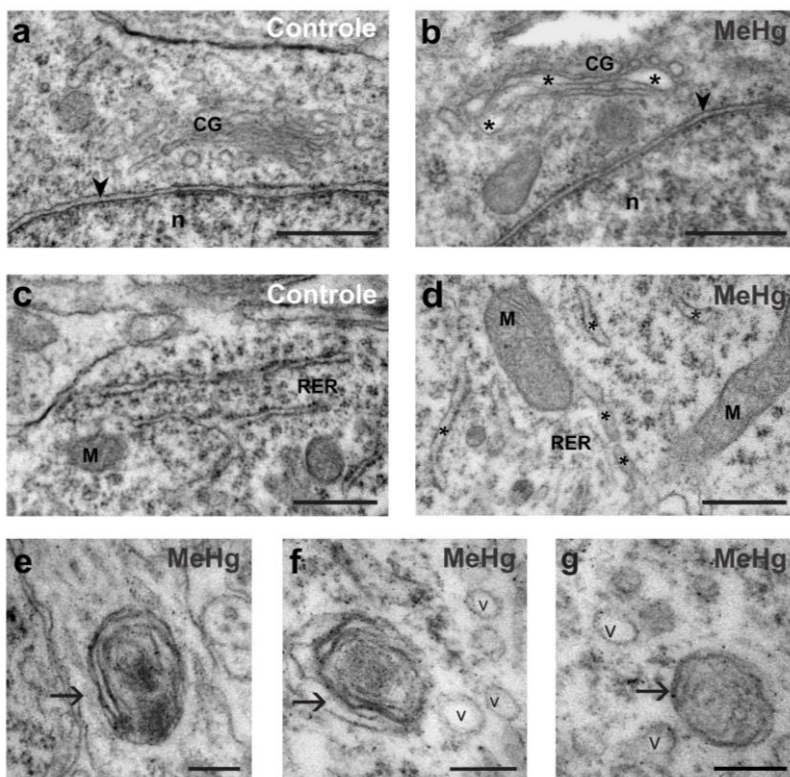


Figura 16. Efeito do MeHg sobre o sistema de endomembranas das células da medula espinal em embriões em E10. Eletromicrografias da camada do manto mostrando corpos de Golgi (CG) e retículo endoplasmático rugoso (RER) em embriões controle (**a**, **c**) e tratados com MeHg (**b**, **d**). Cisternas levemente dilatadas (*) nos CG e RER, e inclusões citoplasmáticas com membranas concêntricas (setas) observadas em embriões tratados com MeHg (**e** – **g**). Abreviaturas: envoltório nuclear (cabeça de seta), núcleo (n), mitocôndrias (M), membranas concêntricas (setas), vesículas membranosas (v). Barra de escala: a - d: 0,5 μ m. e - g: 200 η m

A medula espinal de embriões tratados com MeHg apresentou mitocôndrias com diversas alterações, como edemas na região das cristas mitocondriais (Fig.17 d – e) e entre as membranas mitocondriais interna e externa (Fig.17 f). Rupturas na membrana mitocondrial externa e desestruturação nas cristas mitocondriais (Fig. 17 e) também foram observadas no grupo tratado com MeHg. Além de alterações

ultraestruturais, mitocôndrias com morfologia encurvada, como as mitocôndrias em formato de cálice (*cup*) (Fig. 18 a) e em forma de anel (*donut*) (Fig. 18 b - c) foram observadas em maior número em embriões do grupo tratado com MeHg. Análises quantitativas realizadas a partir eletromicrografias mostraram que o número total de mitocôndrias não difere de forma significativa entre os grupos controle ($11,63 \pm 0,81$) e tratado com MeHg ($12,53 \pm 1,13$, $p > 0.05$) (Fig. 18 d). A análise estatística mostra que o número de mitocôndrias alteradas em embriões tratados com MeHg ($1,97 \pm 0,85$) é significativamente maior que o observado em embriões do grupo controle ($0,10 \pm 0,06$, $p < 0.05$) (Fig. 18 e). O quadro 3 mostra os dados obtidos nas análises quantitativas das mitocôndrias.

A análise ultraestrutural mostrou mitocôndrias com perfil compatível com fissão e fusão nos grupos controle e tratados com MeHg. No grupo controle foram observadas fusão lateral (Fig. 19 a - b), bem como fusão a partir das extremidades mitocondriais (Fig. 19 c). No grupo tratado com MeHg poucas imagens de fusão mitocondrial foram observadas (Fig. 19 e). A análise estatística indicou redução significativa no número de mitocôndrias com perfil compatível ao de fusão no grupo tratado com MeHg ($0,17 \pm 0,08$), comparado ao observado no grupo controle ($0,77 \pm 0,18$, $p < 0.05$) (Fig. 19 g).

A fissão mitocondrial é um mecanismo importante para geração de novas mitocôndrias, sendo que neste processo as mitocôndrias apresentam aspecto de halteres (Fig. 19 c - f). Este mecanismo foi avaliado em embriões controle e tratados com MeHg sendo observadas várias mitocôndrias com perfil de fissão em ambos os grupos (Fig. 19 c, d, f). As análises estatísticas mostraram que o número de mitocôndrias com perfil de fissão não é alterado pela ação do MeHg ($0,23 \pm 0,09$), pois este grupo não apresentou diferença significativa em relação ao observado nos embriões do grupo controle ($0,43 \pm 0,12$ $p < 0.05$) (Fig. 19 h).

Indícios de mitofagia foram identificadas em células de embriões expostos ao MeHg. A mitocôndria em processo de mitofagia, como observado na figura 20, está encapsulada em uma vesícula membranosa, com a qual o retículo endoplasmático parece fazer conexão, através de prolongamentos de membranas. A mitocôndria contida nessa vesícula ainda apresenta as membranas interna e externa preservadas.

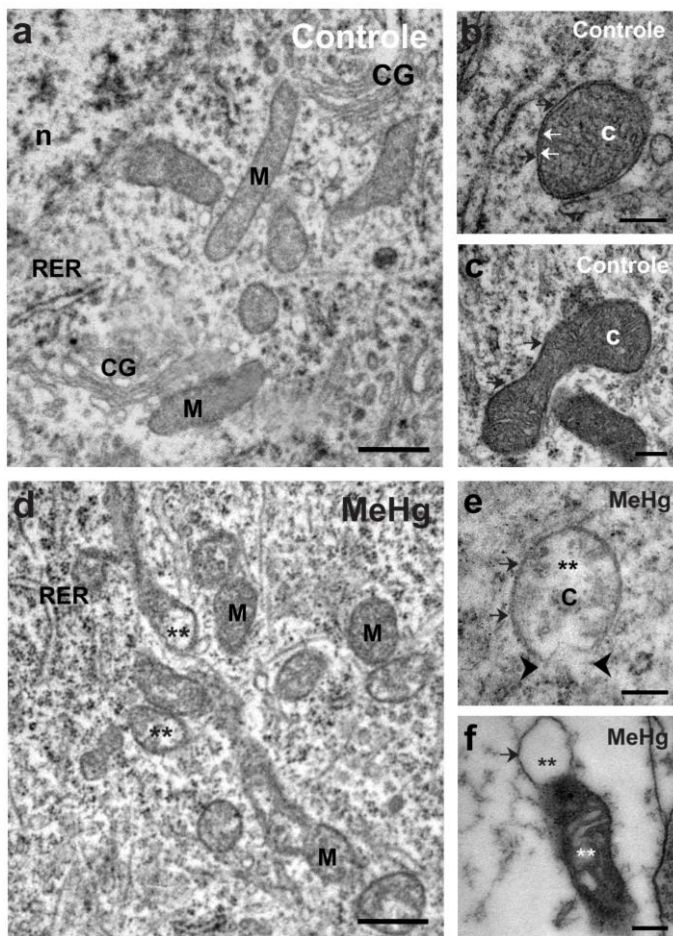


Figura 17. Efeito do MeHg sobre as mitocôndrias na medula espinal de embrião em E10. Eletromicrografias da camada do manto de embriões controle (**a - c**) e tratados com MeHg (**d - f**). As mitocôndrias (M) na medula espinal de embriões controle apresentam ultraestrutura do tipo tubular com cristas mitocondriais (c) e membranas interna (seta branca) e externa (seta preta) bem organizadas podendo ser vistas nos planos transversal (b) e longitudinal (c). As mitocôndrias de embriões tratados com MeHg apresentam rupturas nas membranas mitocondriais externas (cabeça de seta preta) (**e**), edemas (**) entre as cristas mitocondriais (**e - f**) e edemas entre as membranas mitocondriais interna e externa (**f**). Abreviaturas: núcleo (n), retículo endoplasmático rugoso (RER), corpos de Golgi (CG). Barra de escala: a - d: 1 μ m. b, c, e, f: 200 η m.

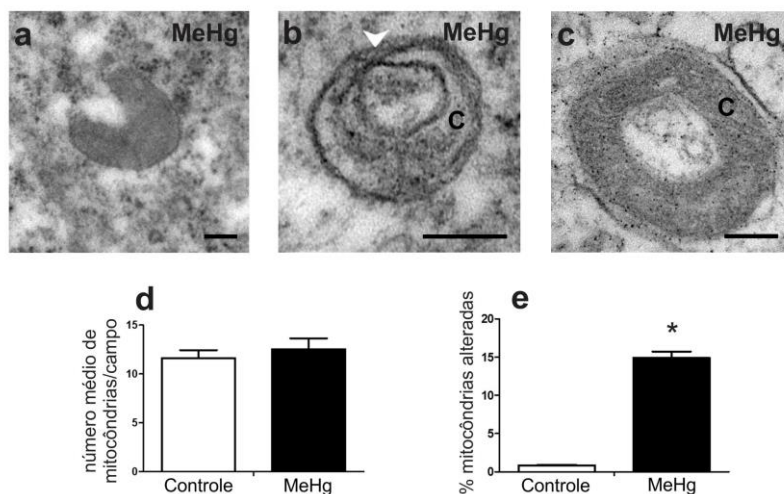


Figura 18. Quantificação das mitocôndrias e formas mitocondriais incomuns em embriões em E10.

Morfologias mitocondriais incomuns dos tipos *cup* (a) e *donut-like* (b - c), foram observadas em embriões tratados com MeHg. O gráfico (d) ilustra o número total de mitocôndrias, e o gráfico (e) a porcentagem de mitocôndrias alteradas nos grupos controle e tratados com MeHg. * Indica $p < 0.05$. A quantificação das mitocôndrias foi realizada a partir de eletromicrografias de embriões controle e tratados com MeHg ($n=30$ para cada grupo) no aumento 20.000x. Ponto de autofusão mitocondrial (cabeça de seta branca) para a formação da morfologia *donut-like*. Barra de escala: a - c: 200 nm.

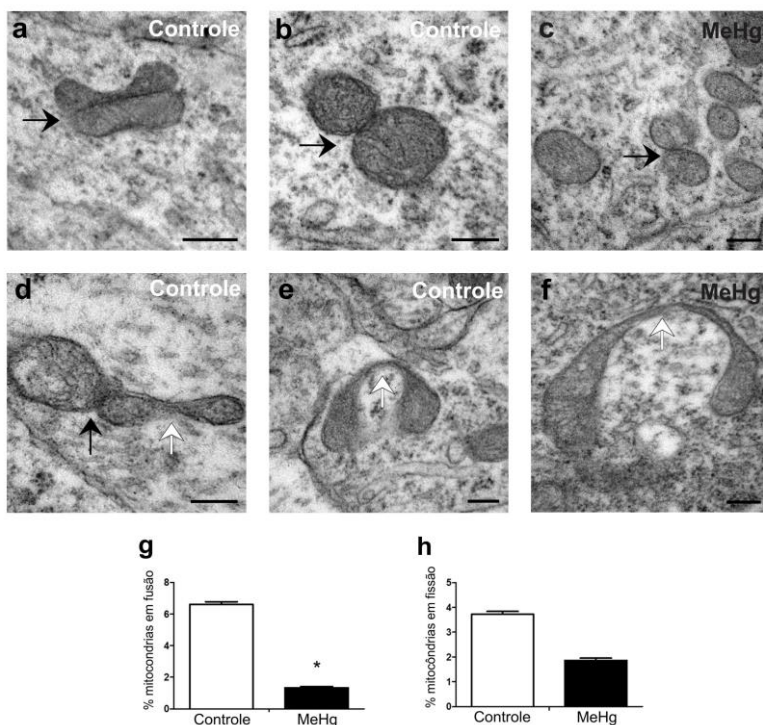


Figura 19. Efeito do MeHg sobre o perfil mitocondrial de fusão e fissão na medula espinhal de embriões em E10. Eletromicrografias da camada do manto de embriões controle (a – b, d – e) e tratados com MeHg (c, f). Mitocôndrias com perfil de fusão (a – d) e fissão (d – f), foram observadas em ambos os grupos analisados. O Gráfico (g) ilustra a porcentagem de mitocôndrias com perfil de fusão, e o (h) a porcentagem de mitocôndrias com perfil de fissão. Ponto de fusão mitocondrial (seta preta). Ponto de fissão mitocondrial (seta branca) * Indica $p < 0.05$. A quantificação das mitocôndrias foi realizada a partir de eletromicrografias de embriões controle e tratados com MeHg ($n=30$ para cada grupo) no aumento 20.000x. Barra de escala: a - f: 200 η m.

Tabela 2. Análise quantitativa das mitocôndrias na camada do manto de embriões sem E10.

	Controle		MeHg	
Nº total de mitocôndrias	349		376	
	Nº absoluto	Nº relativo (%)	Nº absoluto	Nº relativo (%)
Nº de mitocôndrias alteradas	3	0.9	56	14.9
Nº de mitocôndrias em perfil de fissão	13	3.72	7	1.86
Nº de mitocôndrias em perfil de fusão	23	6.60	5	1.33

As análises quantitativas foram realizadas a partir de eletromicrografias na ampliação 20.000 x, em que cada eletromicrografia foi considerada um campo de contagem. O número total de mitocôndrias presentes para cada campo foi obtido por contagem direta. Os valores de todos os campos analisados foram somados para a obtenção do número total de mitocôndrias. Foram analisadas 30 eletromicrografias obtidas a partir de 3 embriões por grupo (controle e tratado com MeHg). Os dados são representados como número absoluto (total) e número relativo (percentagem).

Células em processo de morte foram identificadas na camada do manto da medula espinhal de embriões tratados com MeHg (Fig. 21). Estas células apresentam vários compartimentos internos delimitados por membranas (Fig. 21 d, h) que assemelham-se a vacúolos autofágicos ou autofagossomos, apresentando graus variados de maturação (Fig. 19 b). Nos autofagossomos que apresentam menor eletrondensidade é possível identificar no seu interior organelas ainda não degradadas, como as mitocôndrias (Fig. 21 d, f). Autofagossomos com maior eletrondensidade e conteúdo amorfo, sugerem grau avançado de autólise dos componentes celulares (Fig. 21 c, h). As células em processo de morte, observadas apenas nos embriões tratados com MeHg estão delimitadas por suas membranas e não apresentam extravasamento de conteúdos. Esta incidência de morte celular parece ocorrer em apenas algumas células, pois ao redor destas podem ser observadas outras células com membrana plasmática e nuclear e cromatina bem preservadas (Fig. 21 g).

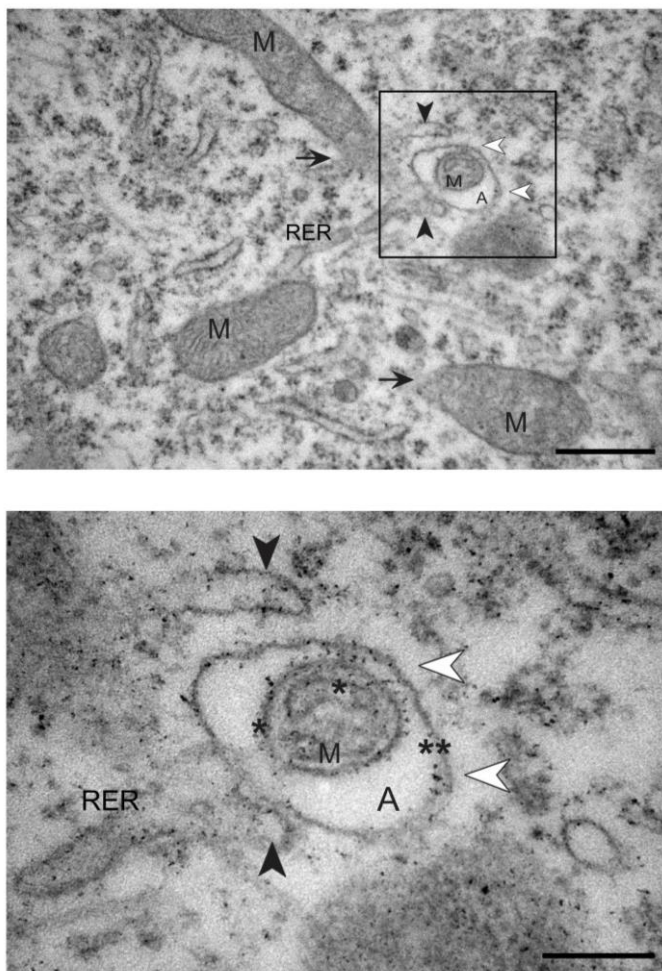


Figura 20. Mitofagia na medula espinhal de embriões em E10 tratados com MeHg. Eletromicrografia da camada do manto de embrião tratados com MeHg mostrando mitocôndrias (M) com rupturas na membrana mitocondrial externa (setas) e processo de mitofagia (cabeça de seta branca) sugerindo que MeHg pode estar aumentando o processo de englobamento e autólise de mitocôndrias danificadas. O inserto mostra detalhe da mitocôndria em processo de mitofagia, a qual está envolvida pela membrana (**) do vacúolo autofágico (A), e apresenta membranas mitocondriais íntegras (*). O retículo endoplasmático rugoso (RER) pode ser visto próximo ao vacúolo autofágico (cabeça de seta preta). Barra de escala: a- 500 μ m. b: 200 η m.

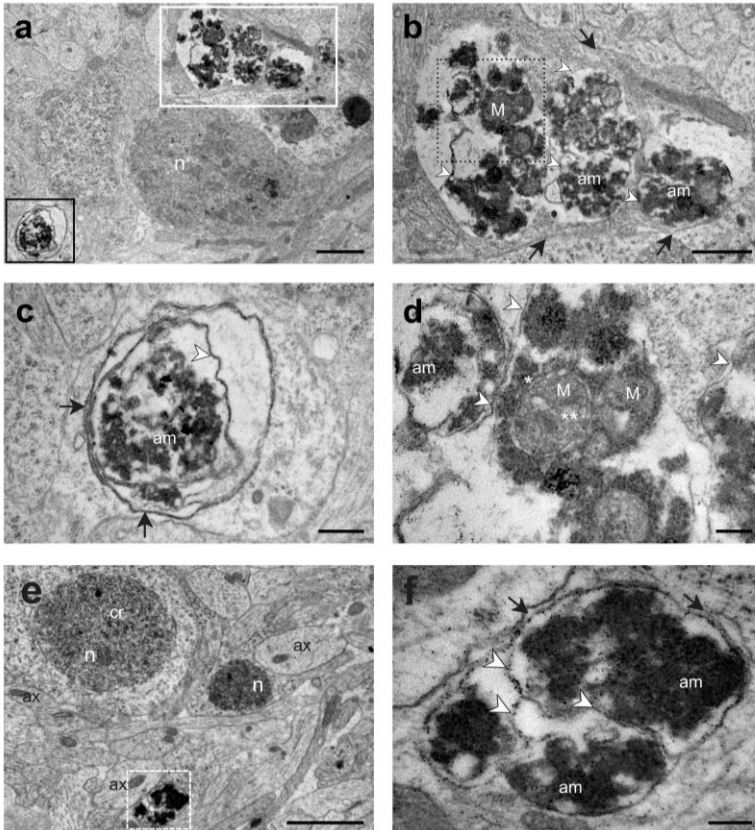


Figura 21. Morte celular autofágica na camada do manto da medula espinhal de embriões tratados com MeHg. Eletromicrografias mostrando células em processo de morte em embriões em E10 (**a - f**). As membranas celulares delimitam as células (seta preta), e membranas internas delimitam compartimentos celulares semelhantes a autofagossomos (cabeça de seta branca) (**b - d**). Alguns destes autofagossomos apresentam mitocôndrias (M) com suas membranas externa (*) interna (**) ainda preservadas (**d**), outros autofagossomos apresentam conteúdo amorfo (am) e mais eletrondenso (**c, f**). **a:** Camada do manto de embriões E10 em menor aumento. **b:** Detalhe de célula contida no quadro branco em (**a**). **c:** Detalhe do quadro preto em (**a**). **d:** Detalhe do quadro pontilhado em (**b**) mostrando mitocôndrias ainda não degradadas no interior de um autofagossomo. **e:** Células na região do manto apresentando núcleo (n), cromatina (cr) bem homogênea e nucléolo (nl) evidentes. A célula em destaque está em processo de morte. **f:** Detalhe da célula contida no quadro tracejado em (**e**). Axônios (ax) de neurônios podem ser vistos em corte transversal. Barra de escala- **a, e:** 2 μ m; **b:** 1 μ m; **c:** 0.5 μ m; **d, f:** 0.2 μ m.

4.6 EFEITO DO MeHg SOBRE A DIFERENCIAÇÃO NEURONAL

Tendo em vista a importância do mecanismo de diferenciação durante o desenvolvimento, avaliamos a ação do MeHg sobre a diferenciação neuronal na medula espinhal de embriões em E10. Análises de imunofluorescência utilizando anticorpos anti- β tubulina III mostraram marcações positivas nas células das camadas do manto (Fig. 22 g - l) e marginal (Fig. 22 m - r) de ambos os grupos analisados. A camada ependimal, por ser formada por células indiferenciadas, não apresentou marcações para β -tubulina III (Fig. 22 a - f). A avaliação por citometria de fluxo mostrou que o tratamento com MeHg não ocasionou alterações significativas na expressão de β -tubulina III nos embriões tratados (517.33 ± 1.85), 28.74% de eventos β tubulina III-positivos, comparado aos embriões controle (424.0 ± 40.91 , $p > 0.05$), 23% de eventos β tubulina III-positivos (Fig. 22 s - t).

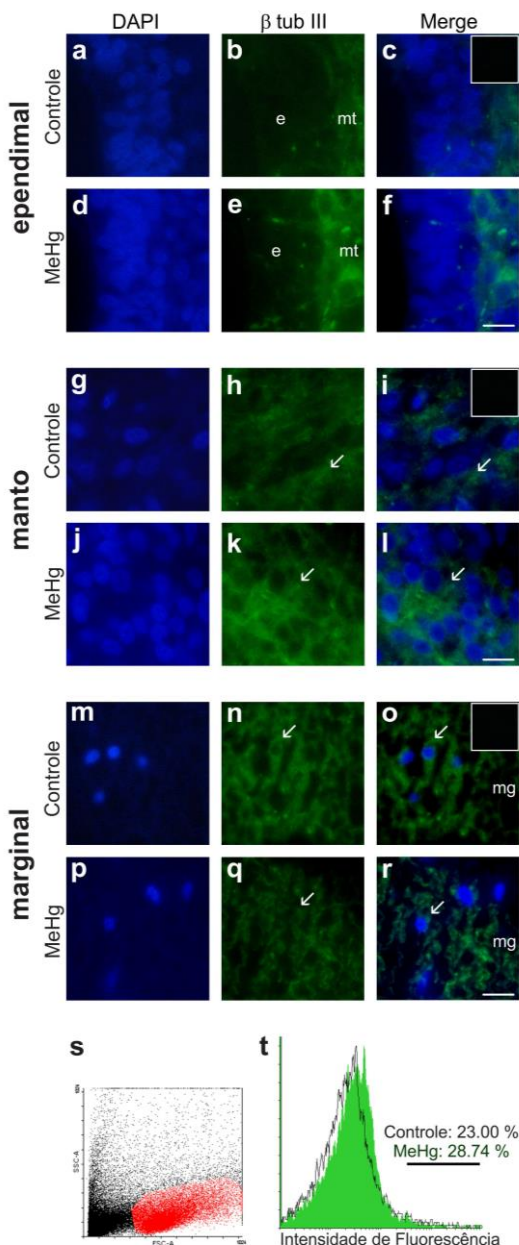


Figura 22. Expressão da proteína β -tubulina III na medula espinhal de embriões em E10.

Secções transversais de embriões controle (a - c, g - i, m - o) e embriões tratados com MeHg (d - f, j - l, p - r) analisadas por imunofluorescência.

Marcações β -tubulina III-positivas (setas) são visíveis em ambos os grupos analisados nas camadas do manto (mt) e marginal (mg), porém são ausentes na camada de ependymal (e). Os inserts em c, i, o, representam controle negativo da imunohistoquímica. O gráfico em dotplot (s) com mostra região selecionada para análises por citometria de fluxo. A análise do perfil de expressão e frequência relativa de células β -tubulina III-positivas (t) mostra que não há diferença entre os grupos analisados. Para cada tratamento, 20.000 eventos foram analisados com uma média de 1.800 eventos positivos. n total = 6 embriões por grupo de 3 experimentos independentes. Barra de escala- a - r: 10 μ m.

4.7 RESUMO DOS RESULTADOS OBTIDOS

O quadro 3 mostra o efeito do MeHg sobre cada uma das camadas da medula espinhal de embriões em E10, nos mecanismos celulares envolvidos no desenvolvimento da medula espinhal (proliferação, diferenciação e morte celular) com ênfase nos marcadores de ciclo celular e dano ao DNA (ciclina E, p21, γ H2A.X). A intensidade da resposta para cada mecanismo/ efeito foi diferente nas camadas da medula espinhal, e por isso representada por setas com diferentes espessuras. De acordo com os dados apresentados, a camada mais afetada pela ação do MeHg é a do manto, onde em E10 está ocorrendo a maior parte dos mecanismos celulares.

Quadro 3- Efeito do MeHg sobre os mecanismos celulares de proliferação, morte e diferenciação; e expressão de marcadores de ciclo celular e dano ao DNA.

	Marcador	Ependimal	Manto	Marginal
Proliferação	pHH-3	↓	↓	
	ciclina E			
	p21	↑	↑	↑
Dano a DNA	γ - H2A.X		↑	
Morte	Tunel		↑	
Diferenciação Neuronal	β tubulina III			

A figura 23 ilustra resumidamente o efeito do MeHg sobre as células da medula espinhal em desenvolvimento. O MeHg age sobre as células da medula espinhal causando redução da espessura de suas camadas. O efeito deste organometal sobre estas células causa dano ao DNA e às mitocôndrias. Estes danos associados a indícios de alteração na dinâmica mitocondrial de fusão e aumento na mitofagia, podem causar aumento de morte celular.

O aumento expressivo de p21 na medula espinhal pode ser uma resposta celular à situação de estresse, causando retenção da célula na fase G1 do ciclo celular provavelmente por inibir a atividade de ciclina E - CDK. Com a suspensão do ciclo celular a proliferação celular seria reduzida e menor número de progenitores neurais seriam gerados.

Os danos celulares e perturbação no ciclo celular estariam prejudicando o equilíbrio entre proliferação e morte celular, mecanismos básicos do desenvolvimento, os quais causariam redução na espessura das camadas da medula espinhal comprometendo o desenvolvimento do SNC.

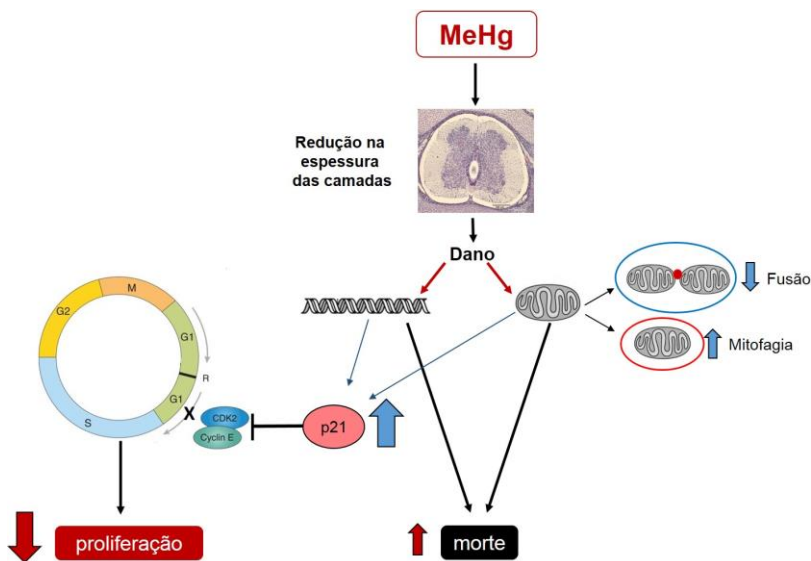


Figura 23. Resumo esquemático dos efeitos do MeHg sobre a medula espinhal de embriões em E10.

V DISCUSSÃO

No presente estudo, uma única injeção de MeHg administrada no saco vitelino durante o processo de formação inicial do SNC (E3), reduziu a espessura das camadas da medula espinhal de *G. domesticus*, quando avaliada em fase tardia do desenvolvimento do SNC (E10). Essa redução parece estar relacionada à diminuição da proliferação celular que, por sua vez, está associada ao aumento da expressão de p21, que causa retenção da célula em G1. Além disso, a dose utilizada tem ação genotóxica, pois causa dano ao DNA e induz as células da camada do manto à morte por apoptose. Alterações mitocondriais e aumento na formação de inclusões citoplasmáticas concêntricas indicam citotoxicidade, que pode causar autofagia e ainda morte autofágica na camada do manto.

O índice de mortalidade dos embriões no período pós-tratamento foi igual para os grupos controle e tratado com MeHg. Tendo em vista que as mortes ocorreram em ambos os grupos e não havendo relatos de anomalias congênitas aparentes em exposição a baixas doses de MeHg em aves (HEINZ et al., 2009), elas podem ser atribuídas a fatores externos e internos inerentes ao desenvolvimento embrionário (POURLIS, 2001). Em doses subletais, o mercúrio atua sobre mecanismos celulares e sinalização celular, não alterando a morfologia dos órgãos, o que também foi observado nos estudos realizados por Carvalho et al. (2008) que utilizaram a mesma dose de MeHg em embriões de galinha, os quais foram expostos ao metal em E5.

5.1 A INCORPORAÇÃO DO MeHg E SEU EFEITO SOBRE AS CAMADAS CELULARES DA MEDULA ESPINHAL

A administração do MeHg em área vascularizada facilitou a incorporação deste organometal pelo embrião, por isso em estudos de toxicidade por metais pesados o saco vitelino é muito utilizado para a injeção da solução. Além disso, esta técnica foi validada por estudos de neurotoxicologia do desenvolvimento utilizando acetato de chumbo (MULLER et al., 2008; MULLER et al., 2012) e MeHg (CARVALHO et al., 2008).

Análises *in vivo* utilizando metais pesados requerem o estabelecimento adequado do tempo de exposição para que os possíveis efeitos sejam avaliados. Durante a elaboração do desenho experimental, testes preliminares (dados não mostrados) demonstraram que um tempo de exposição menor que 7 dias não foi suficiente para a incorporação de

MeHg pelos embriões. Além do tempo de exposição considerado, a definição das idades para tratamento e de análise também foram importantes para a eficácia do modelo experimental. Neste estudo, a idade E3 foi escolhida para tratamento porque o tubo neural está completamente fechado, em plena atividade de proliferação e iniciando processos de diferenciação e migração. Na idade de análise, E10, o embrião já consumiu boa parte do vitelo juntamente com o metilmercúrio que foi injetado. Em E10 é possível observar as camadas da medula espinhal bem definidas, bem como os mecanismos celulares de proliferação, morte e diferenciação.

A deposição de mercúrio foi identificada na medula espinhal de embriões tratados pela presença de grânulos marrons. Os grânulos de deposição foram identificados nas três camadas da medula espinhal dos animais tratados com MeHg, comprovando que nesta fase do desenvolvimento (E10) o metal já foi incorporado pelo embrião e está depositado nos tecidos neurais.

O MeHg depositado principalmente nas camadas endodimal e do manto indica que a dose utilizada pode estar perturbando o desenvolvimento do SNC, pois análises morfométricas mostraram redução de espessura nas camadas do manto e marginal. A maior deposição nas camadas endodimal e do manto está provavelmente relacionado ao fato de que estas camadas são compostas por maior número de células, sendo que a camada marginal além de menor número de células é constituída em grande parte por prolongamentos das células neurais, que não apresentaram deposição do metal.

Carvalho et al (2008), ao administrar a mesma dose aqui utilizada em embriões de galinha (E5), demonstraram que o cerebelo em PN5 apresenta maior deposição de MeHg nas camadas camada granular e de Purkinje, as quais são equivalentes às camadas endodimal e manto da medula espinhal em desenvolvimento. Assim como a camada marginal da medula espinhal E10, a camada molecular do cerebelo apresentou pouca deposição de mercúrio. Diferente dos resultados de Carvalho e colaboradores (2008) que observaram maior distância entre as células e menor número de neurônios de Purkinje, a medula espinhal não apresentou alterações morfológicas em E10, entretanto alterações morfométricas significativas foram identificadas.

Os resultados obtidos por análises morfométricas da medula espinhal de embriões de galinha E10 remetem a estudos morfológicos clássicos que avaliaram a ação do MeHg durante o desenvolvimento do SNC. Nestes estudos, cérebro e cerebelo de camundongos e humanos, intoxicados por este metal, apresentaram redução no tamanho e

espessura das camadas (MATSUMOTO et al., 1965; CHOI et al., 1978; SAGER et al., 1982; RODIER et al., 1984). Mais recentemente, estudos avaliando a ação do MeHg sobre o SNC de vertebrados, associando técnicas de análise morfométrica e ferramentas de biologia molecular, observaram alterações nas dimensões de cérebro, cerebelo e hipocampo, associadas a alterações nos mecanismos de proliferação e morte celular (SAKAMOTO et al., 2004; FALLUEL-MOREL et al., 2007; HO et al., 2013).

5.2 O EFEITO DO MeHg SOBRE O CICLO CELULAR

A redução significativa da proliferação celular nas camadas endodimal e do manto nos embriões tratados com MeHg mostra associação entre redução na proliferação com a deposição MeHg, reforçando a característica de agente antimitótico do MeHg sobre os tecidos neurais (PONCE et al., 1994; BURKE et al., 2006; XU et al., 2010).

Nossos resultados mostraram que MeHg causou redução significativa na proliferação celular da camada endodimal, principal fonte de progenitores neurais. Esta alteração pode trazer consequências graves ao desenvolvimento da medula espinhal, pois, assim o MeHg está prejudicando indiretamente outros mecanismos celulares como a diferenciação e migração que ocorrem em seguida à proliferação, e que têm igual importância para a estruturação das camadas da medula espinhal. Os resultados obtidos neste estudo corroboram dados obtidos em estudos realizados *in vivo* avaliando hipocampo de roedores (FALLUEL-MOREL et al., 2007) e tubo neural de peixes (*Danio rerio*) (HASSAN et al., 2012) e anfíbios (*Xenopus leavis*) (HUYCK et al., 2015), os quais demonstraram redução de células em proliferação após tratamento com MeHg. Deste modo, pode-se concluir que a proliferação celular é um mecanismo alterado pelo MeHg na medula espinhal em diferentes fases de seu desenvolvimento, mesmo submetido a baixas doses, como a administrada neste estudo. Além disso, MeHg parece exercer seus efeitos anti-mitóticos em vários órgãos do SNC, provocando redução no número de células em proliferação e indicando que os mecanismos de ação deste metal podem ser semelhantes entre espécies.

A hipótese de comprometimento da proliferação celular e ciclo celular por MeHg vem sendo explorada focalizando a inibição de mitose por perturbação das fases G1 e G2 do ciclo celular (SAGER et al., 1982; RODIER et al., 1984; PONCE et al., 1994). Entretanto, informações

sobre as proteínas que participam do controle do ciclo celular ainda são escassas.

O ciclo celular é um processo dinâmico que inclui a participação de várias proteínas que atuam como promotoras ou inibidoras, as quais podem ter a sua expressão modificada de acordo com as condições ambientais na célula. A proteína p21, conhecida como inibidor das fases G1 e G2 do ciclo celular (HARPER et al., 1993), apresentou aumento significativo em sua expressão após o tratamento com MeHg, com forte marcação nas camadas endodérmica e manto. Estas camadas apresentaram maior deposição de mercúrio, sugerindo que este metal seja o causador do aumento de expressão de p21, como observado por Ou et al. (1999) e Faustmann et al. (2002), analisando linhagens neurais *in vitro*. A associação de aumento de p21 com a redução da proliferação após uso de MeHg, sugerem que esta proteína pode estar sendo um importante sinalizador para a suspensão do ciclo celular na medula espinhal em desenvolvimento.

A proteína ciclina E tem sido evidenciada como um alvo da neurotoxicidade por MeHg *in vitro* (BURKE et al., 2006; XU et al., 2010) e *in vivo* (FALLUEL-MOREL et al., 2007), por isso a hipótese de redução na sua expressão na medula espinhal em embriões de galinha foi proposta. Contrariando as expectativas, a expressão de ciclina E não apresentou alteração no modelo de estudo e dose avaliados. Deste modo a hipótese de p21 atuar como importante via de sinalização na suspensão do ciclo celular em G1 foi reforçada, possivelmente por inibir a atividade do complexo ciclina E - CDK2, pois o aumento da expressão de p21 altera a expressão de CDK2 (HARPER et al., 1993). O aumento na expressão de p21 normalmente é requerido em situação de estresse celular com dano ao DNA (HARPER et al., 1993) que o MeHg mesmo em baixas concentrações (abaixo de 1 μ M), tem apresentado efeito genotóxico sobre linhagens celulares neurais e não neurais (CRESPO LOPEZ et al., 2009; 2011; BEN-OZER et al., 2000; ÇAVAS et al., 2008).

5.3 DANOS CELULARES INDUZIDOS POR MeHg

Células γ -H2A.X positivas foram encontradas na camada do manto, demonstrando o efeito genotóxico deste metal na dose utilizada. O dano ao DNA pode ter ocasionado sequências de sinalização intracelular que contribuíram para a super expressão de p21, além disso danos ao DNA não reparados podem levar as células à morte celular por apoptose (BELLETTI et al., 2002). Células em apoptose foram

identificadas principalmente na camada do manto de embriões tratados com MeHg, a mesma camada onde foram encontradas as células γ -H2A.X- positivas. A combinação destes dados reforça o argumento de que a toxicidade causada por MeHg sinaliza a morte celular programada apoptótica no SNC em desenvolvimento (SAKAMOTO et al., 2004; FALLUEL-MOREL et al., 2007; HUYCK et al., 2015). Entretanto, outras vias de sinalização podem desencadear morte celular em linhagens neurais, por exemplo as vias apoptóticas desencadeadas por danos às mitocôndrias, envolvendo alteração na expressão de proteínas pró e anti - apoptóticas (TAMM et al., 2006; LU et al., 2011; POLUNAS et al., 2011; SOKOLOWSKI et al., 2013).

Vários tipos de alterações mitocondriais foram identificadas em embriões tratados com MeHg, semelhante ao observado por Carranza-Gonzales et al. (2005) e Glaser et al. (2014) ao analisar cérebro e rim de animais adultos.

As mitocôndrias são organelas alvo da ação oxidativa do MeHg, que provoca danos às suas estruturas e compromete a atividade de proteínas essenciais para a sua função (BELLETTI et al., 2002; MORI et al., 2007; GLASER et al., 2010, 2014) além de causar aumento na geração de espécies reativas de oxigênio (FARINA et al., 2011a). Adicionalmente, dados de Carvalho e colaboradores (2008) mostraram aumento na geração de moléculas e enzimas antioxidantes (glutathione, glutathione reductase e glutathione peroxidase), em doses similares às utilizadas nos ensaios com medula espinhal. Estes dados em conjunto sugerem que MeHg pode estar causando estresse oxidativo ao SNC de embriões em E10.

O aparecimento de mitocôndrias com formas *donut-like* e *cup-like* nas células da medula espinhal E10 também são indícios do estresse oxidativo gerado por MeHg, tendo em vista que estas formas mitocondriais não são comuns e aparecem em situações de estresse oxidativo em células animais (LIU; HAJNOCZKY, 2011; HARA et al., 2013, AHMAD et al., 2013; LIONETTI et al., 2014) e vegetais (BARRETO et al., 2014). A modificação de forma nas mitocôndrias é sugerida como um mecanismo de defesa para proteger suas estruturas e otimizar a atividade em situações de estresse, como tentativa de retornar à homeostase (BERNARD; ROSSIGNOL, 2008; CAMPELLO; SCORRANO, 2010).

Os danos ao DNA, o aumento na expressão de p21 e os danos mitocondriais observados nas células da medula espinhal de embriões em E10 sugerem aumento de ROS após exposição ao MeHg. Além disso, estes efeitos, em conjunto podem explicar o aumento no número

de células em apoptose observado na camada do manto de embriões tratados com MeHg.

Em embriões, a apoptose é o tipo de morte celular programada mais comum, pois está associada à morfogênese de alguns órgãos, como os membros, cérebro e rins (DOSSEF, 2004). Este tipo de morte tem como características principais a ativação de cascatas de caspases, com fragmentação de DNA e do citoesqueleto nos primeiros momentos da sinalização, levando à redução celular (FULDA et al., 2010). As células marcadas pela técnica de TUNEL na camada do manto de embriões tratados com MeHg apesar de ainda apresentarem o núcleo bem delimitado, são positivas para a técnica de TUNEL, que marca pontas livres em DNA fragmentado, sinal de apoptose.

A morte celular pode ser evitada pela célula por reparo ou degradação de moléculas e organelas danificadas. A suspensão do ciclo celular em G1 por aumento de p21 nas células da medula espinhal de embriões tratados com MeHg pode ser uma tentativa de reparo ao DNA danificado e retorno ao ciclo celular. Além disso, as mitocôndrias também podem ter ativado mecanismos de reparo em uma tentativa de evitar mitofagia.

As mitocôndrias produzem continuamente ânions superóxido altamente reativos como um subproduto de transporte de elétrons durante a fosforilação oxidativa. Estas espécies reativas de oxigênio (ROS) causam danos às proteínas, lipídios e DNA mitocondrial, por isso as mitocôndrias possuem proteases para eliminar estruturas danificadas. Este sistema de reparo funciona como “controle de qualidade mitocondrial”, detectando e corrigindo danos menores, sem a necessidade de alterar a taxa de fissão ou fusão (BAKER; TATSUTA; LANGER, 2011). Um outro nível de controle de qualidade envolve a eliminação da mitocôndria por autofagia, um processo necessário para a manutenção de uma rede mitocondrial saudável, eliminando assim organelas velhas e danificadas (KOMATSU et al., 2005; YOULE; VANDERBLIEK, 2012).

A figura 18 ilustra processo de autofagia envolvendo uma mitocôndria (mitofagia) em embrião tratado com MeHg. O processo em questão mostra uma mitocôndria no interior de um vacúolo autofágico aparentemente formado com a participação do retículo endoplasmático. Membranas desta organela podem ser vistas em contato com o autofagossomo, sugerindo contribuição na formação deste como sugerido por Mcvicar et al. (2015). Esta imagem indica que as células embrionárias da medula espinhal tratadas com MeHg podem estar

tentando manter a homeostase celular, através da eliminação de mitocôndrias danificadas.

A mitofagia pode ocorrer associada à fissão mitocondrial por separar as porções mitocondriais funcionais de porções danificadas, destinando estas últimas à mitofagia (YOULE; VAN DER BLIEK, 2012). Lionetti et al (2014) evidenciaram aumento da expressão de DRP-1 e Fis, dois marcadores de fissão mitocondrial, e do número de mitocôndrias em fissão, em células hepáticas submetidas a estresse oxidativo. Este mecanismo mitocondrial, que também é importante para a geração de novas mitocôndrias, não se mostrou alterado na medula espinhal de embriões tratados com MeHg. O aumento na mitofagia observado em embriões deste grupo pode ser um reflexo da baixa efetividade do mecanismo de fissão na recuperação dos danos mitocondriais, ou por outro lado, o MeHg poderia estar alterando a expressão de moléculas importantes para a fissão.

A fusão mitocondrial também pode contribuir para recuperação de danos mitocondriais. Em casos de danos leves à mitocôndria, a fusão pode minimizar o efeito deletério por aumentar a área mitocondrial na tentativa de neutralizar o dano. Quando este é muito grave, a mitocôndria é destinada a mitofagia como forma de não contaminar as demais (YOULE; VAN DER BLIEK, 2012). Os dados obtidos em embriões tratados com MeHg mostraram redução significativa no número de perfis mitocondriais de fusão. Estes resultados assemelham-se ao observado por Lionetti e colaboradores (2014), que além de aumento na formação de espécies reativas de oxigênio, observaram redução na expressão de proteínas Mfn2 e OPA-1, e redução no número de mitocôndrias em fusão.

Tendo em vista que o MeHg está associado ao estresse oxidativo por aumentar espécies reativas de oxigênio (FARINA et al., 2011a) e que a dose utilizada neste ensaio parece aumentar a produção de ROS em SNC em desenvolvimento (CARVALHO (et al., 2008), sugerimos que MeHg pode estar provocando alteração na expressão de proteínas de fissão e fusão mitocondrial durante o desenvolvimento da medula espinhal, por causar aumento de espécies reativas de oxigênio.

A literatura mostra que os vertebrados possuem um eficiente sistema de defesa para impedir que mitocôndrias danificadas gravemente se fusionem com outras saudáveis através de inativação proteolítica da dinamina de fusão interna OPA1 (*optic atrophy protein-1*) por uma protease denominada OMA (*ATP-independent metalloprotease*) que é ativada em situação de estresse oxidativo (HEAD et al., 2009). Uma outra via de redução de fusão é fornecida

através de ubiquitinação, extração da membrana e degradação de proteínas de fusão de membrana mitocondrial externa Mfn1 e Mfn2 via proteossomos (TANAKA et al., 2010). Estas informações podem ajudar a compreender o modo como as células da medula espinhal de embriões tratados com MeHg estão reagindo frente aos danos mitocondriais. A redução na fusão associada ao aumento na mitofagia pode indicar uma combinação de estratégias protetivas nas células embrionárias da medula espinhal exposta ao MeHg, para eliminar mitocôndrias danificadas e evitar a morte celular. Entretanto, sendo a fusão mitocondrial um mecanismo de importância para tecidos neurais, devido a sua alta demanda energética, a perturbação desta dinâmica pode estar causando prejuízo ao desenvolvimento da medula espinhal. Estes resultados iniciais, apesar de necessitarem de análises complementares por imunomarcação, fornecem importantes indicativos da ação do MeHg sobre a dinâmica de fusão e fissão mitocondrial no SNC em desenvolvimento.

Dilatações nas cisternas do retículo endoplasmático rugoso e dos corpos de Golgi, foram observadas na medula espinhal de embriões expostos a MeHg. Estas alterações indicam que o MeHg pode estar alterando as atividades destas endomembranas, como produção de proteínas específicas, e pode estar contribuindo para a formação de inclusões membranosas concêntricas observadas nos embriões deste grupo. Estas inclusões celulares, ausentes em embriões do grupo controle, assemelham-se a autofagossomos e podem ter sido formadas em resposta ao aumento de estresse oxidativo. Células neurais expostas a MeHg apresentam maior peroxidação lipídica e degradação de proteínas (FRANCO et al 2009; GLASER et al., 2010), as quais poderiam justificar a formação das inclusões concêntricas observadas na medula espinhal. Formações membranosas similares a estas também foram identificadas em estudos relacionados à intoxicação por herbicidas organoclorados (NORBACK; ALLEN, 1972) e organofosforados (ARMILIATO et al., 2014). Nesses estudos, além das formações membranosas concêntricas, foram observadas dilatações nas cisternas dos corpos de Golgi. Tendo em vista a presença de formações membranosas concêntricas com aspecto de vacúolos autofágicos e processo de mitofagia em células da região do manto de embriões E10, sugere-se que MeHg está estimulando processos de autofagia.

O mecanismo de autofagia ocorre para eliminação de estruturas ou organelas danificadas. Este processo também pode ser associado a situações patológicas, de privação nutricional e/ ou estresse oxidativo,

entretanto excesso de autofagia na célula pode conduzi-la à morte celular programada do tipo autofágica (FULDA et al., 2010).

Morte celular programada do tipo II ou autofágica, parece estar ocorrendo em embriões tratados com MeHg. Células do manto de embriões tratados com MeHg apresentaram compartimentos internos delimitados por membranas celulares as quais assemelham-se autofagossomos. Estes compartimentos celulares apresentam conteúdos com diferentes graus de eletrodensidade, sugerindo maior ou menor grau de autólise dos componentes celulares. As células destacadas apresentaram-se delimitadas por membranas, sem extravasamento de seu conteúdo, sem aumento de volume ou edema, indicando que esta não é uma morte necrótica (LEVINE; YUAN, 2005). A morte celular programada do tipo autofágica já foi observada em células de linhagens neurais e não neurais tratadas com metais pesados como cádmio (DONG et al., 2009; CHARGUI et al., 2011) e mercúrio (CHATTERJEE et al., 2014) em doses consideradas baixas (menores que 10 μ M). Além disso a morte autofágica observada em células hepáticas de roedores tratados com mercúrio parecem estar associada a estresse oxidativo e dano ao DNA (CHATTERJEE et al., 2014).

Levando em conta que a morte autofágica foi observada em células submetidas a baixas concentrações de metais pesados (DONG et al., 2009; CHARGUI et al., 2011; CHATTERJEE 2014); e que indícios de autofagia (mitofagia e formações membranosas concêntricas) e morte autofágica têm sido observados na medula espinhal de embriões tratados com MeHg, sugere-se que este organometal, além de promover morte celular programada por apoptose, também esteja ativando as vias de sinalização de morte celular programada do tipo autofágica no SNC em desenvolvimento.

Os neurônios parecem ser alvos da ação de MeHg durante o desenvolvimento (TAMM, et al., 2006; FERRARO et al., 2009; GUO et al., 2012; HE et al., 2012). Além disso Carvalho et al (2008) observaram redução no número de neurônios na camada de Purkinje de aves em desenvolvimento submetidas à mesma dose de MeHg por nós utilizada. Esta camada tecidual é equivalente a camada do manto da medula espinhal, que na idade de E10 apresenta neurônios já diferenciados. Ao contrário do esperado, as análises realizadas neste estudo mostraram que não houve diferença significativa no número e distribuição de células β -tubulina III – positivas na medula espinhal de embriões E10 nas camadas do manto e marginal, indicando que o MeHg não causa a morte de neurônios diferenciados na dose e modelo avaliados. A ausência de marcação para β -tubulina III na camada pendinhal se dá pelo fato desta

camada ser composta por células indiferenciadas e não possuem tal proteína expressa. Estes dados sugerem que a diferenciação neuronal, diferente da proliferação e morte, parece não serem alvo dos efeitos neurotóxicos na medula espinhal. Ho e colaboradores (2013) ao avaliar a expressão de genes envolvidos com a padronização e diferenciação do SN central em peixe (*Danio rerio*), também não encontraram diferença entre os grupos controle e tratado com MeHg. Entretanto, a mesma dose utilizada para análises na medula espinhal de galinha, causou redução significativa de neurônios de Purkinje em embriões de expostos in ovo e avaliados na semana seguinte ao nascimento (CARVALHO et al., 2008). Ensaio *in vitro* também demonstraram redução na expressão de β -tubulina III-positivas em linhagens neurais multipotentes (TAMM et al., 2006) tratadas com MeHg. Estes ensaios sugerem que neurônios de diferentes órgãos podem responder de modo diferente à toxicidade de MeHg. Por outro lado, a interferência de MeHg pode estar ocorrendo em estágios anteriores de diferenciação neuronal e um outro marcador de neurônios pós-mitóticos como Neuro M, talvez seja mais adequado para a investigação. Esta hipótese é reforçada pelo fato de células H2A.X-positivas terem sido identificadas na região de transição entre as camadas endodermal e do manto, onde se localizam muitos progenitores neurais pós-mitóticos. Uma outra possibilidade é a ação do MeHg estar afetando mais intensamente a linhagem glial.

Astrócitos são alvo da toxicidade do MeHg que altera sua atividade de recaptação do glutamato causando excitotoxicidade em neurônios (ASCHNER et al., 2000). Este organometal causa aumento de ROS e redução de GSH dependente de concentração nas células gliais, e a micróglia parece ser a sensível sua toxicidade (NI et al., 2011). Vários estudos sugerem que MeHg atua na sinalização celular promovendo aumento na expressão de genes relacionados a diferenciação em astrócitos (BUZANSKA et al., 2009; TAMM et al., 2008; JEBBETT et al., 2013). Além disso, genes relacionados à neuroproteção como Nrf2 (Nuclear transcription fator-2) também parecem aumentar sua expressão em astrócito (NOGUSHI et al., 2013) e micróglia (NI et al., 2011) como respostas neuroprotetoras após a exposição ao MeHg. A morte celular de astrócitos e micróglia também foi relatada em exposição ao MeHg in vitro (DARE et al., 2001; NI et al., 2011). Um outro metal pesado, o chumbo, parece causar aumento na morte celular de astrócitos na medula espinhal de embriões E9-11 (MULLER et al., 2012) tratados in ovo. Contudo, análises adicionais são necessárias para elucidar questões relacionadas à ação do MeHg sobre a linhagem glial na medula espinhal em desenvolvimento.

VI CONCLUSÕES

Os resultados obtidos a partir dos ensaios realizados com embriões de *G. domesticus* mostram que o SNC em desenvolvimento é sensível à dose de MeHg administrada *in ovo* (0,1µg/50µl) e permitiram melhor compreensão dos efeitos deste organometal sobre os mecanismos celulares e moleculares envolvidos no desenvolvimento das camadas da medula espinhal. Com relação às hipóteses propostas previamente, a maior parte foi aceita e alguns efeitos não esperados foram encontrados. A hipótese 1 proposta para interferência do MeHg na proliferação foi parcialmente aceita. Alterações morfológicas não foram identificadas na organização tecidual das camadas da medula espinhal, porém alterações morfométricas significativas foram encontradas. A proliferação celular foi reduzida por retenção da célula em G1, por aumento significativo de expressão de p21 sem comprometer a expressão de ciclina E. A hipótese 2 foi totalmente aceita pela observação de alteração no sistema de endomembranas e nas mitocôndrias de embriões tratados com MeHg na camada do manto. Morte celular programada de tipos, apoptótica e autofágica foram identificadas na camada do manto de embriões tratados com MeHg, além de perfis mitocondriais indicando alteração nos mecanismos de fissão e fusão e aumento de mitofagia. A hipótese 3 foi rejeitada, pois a dose utilizada parece não interferir na diferenciação final da linhagem neural. Especificamente, as principais conclusões obtidas foram:

1. A deposição de MeHg nas três camadas da medula espinhal com maior concentração nas camadas endodinal e do manto, indicam que MeHg está relacionado com a redução da espessura das camadas do manto e marginal na medula espinhal de embriões tratados com MeHg;
2. A redução na proliferação celular nas camadas endodinal e do manto pode ter sido causada por aumento na expressão de p21, com suspensão do ciclo celular em G1 em resposta à exposição ao MeHg. Já a expressão da proteína ciclina E parece não ser afetada em embriões tratados com MeHg;
3. O efeito genotóxico do MeHg evidenciado pela expressão da proteína γ -H2A.X pode ser a causa do aumento de morte celular programada do tipo apoptótica na camada do manto;
4. Alterações morfológicas nas mitocôndrias, o aparecimento de formas tipo *donut-like* e *cup-like*, bem como indícios de alteração no número de

perfis mitocondriais em fusão foram identificados em embriões tratados com MeHg, sugerindo que a dose utilizada causa toxicidade à mitocôndria;

5. Dilatações nas cisternas dos corpos de Golgi e formações membranosas concêntricas sugerem alterações nos sistemas de endomembranas. A presença de estruturas similares a vesículas autofágicas sugerem aumento de autofagia, que pode ter conduzido à morte celular autofágica células da camada do manto de embriões tratados com MeHg;

6. A expressão da proteína β -tubulina III parece não ser alterada, indicando que os neurônios não estão sendo afetados pelo MeHg na dose e idade avaliadas.

6.1 PERSPECTIVAS

MeHg tem efeito neurotóxico em embriões de *G. domesticus* mesmo sob baixa concentração (2 $\mu\text{g/ml}$). Os resultados aqui apresentados contribuem para a melhor compreensão do efeito embriotóxico deste organometal sobre SNC, demonstrando que sua ação citotóxica e genotóxica interfere em mecanismos básicos durante o desenvolvimento. Estes dados também fornecem elementos para a melhor compreensão de efeitos neuromotores e cognitivos observados em animais expostos a este metal durante o período de desenvolvimento pré-natal. Contudo, estudos adicionais são necessários, sobretudo a respeito da ação do MeHg sobre a expressão de genes relacionados aos mecanismos celulares de proliferação, morte e diferenciação no SNC durante seu desenvolvimento. Informações mais detalhadas sobre a neurotoxicidade durante o desenvolvimento poderão contribuir para elaboração de leis mais rigorosas sobre os limites seguros de exposição a estes metais, além de propostas para redução e /ou substituição de mercúrio por outros metais menos tóxicos na composição de materiais como lâmpadas, amálgamas dentários e conservantes de vacinas. Na tentativa de abrir horizontes, os dados gerados a partir de trabalhos como este poderão subsidiar ações para maior controle de resíduos lançados no ambiente, e a sua transferência através da cadeia trófica. A fiscalização mais efetiva irá colaborar também para segurança alimentar tendo em vista que esta é a principal via de contaminação humana por metais pesados.

VII REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHÁ D.; HINTELMANN, H.; YEE J. Importance of sulfate reducing bacteria in mercury methylation and demethylation in periphyton from Bolivian Amazon region. **Chemosphere**, v.82, p.911–916, 2011.

ALBERTS, B. et al. *Biologia Molecular da Célula*. 5 ed. Porto Alegre: ArtMed, 2010. 1061p

AHMAD, T. et al. Computational classification of mitochondrial shapes reflects stress and redox state. **Cell Death and Disease**, v. 4, e461, 2013.

ALLEN, J.W.; MUTKUS, L.A.; ASCHNER, M. Methylmercury-mediated inhibition of 3HD-aspartate transport in cultured astrocytes is reversed by the antioxidant catalase. **Brain Research**, v. 902, p. 92–100, 2001.

AMORIM, M. I. et al. Cytogenetic damage related to low levels of methyl mercury contamination in the Brazilian Amazon. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 72, n. 4, p. 497-507, 2000.

ARMILIATO, N. et al. Changes in Ultrastructure and Expression of Steroidogenic Factor-1 in Ovaries of Zebrafish *Danio rerio* Exposed to Glyphosate. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A: Current Issues**, v.77, p. 405–414, 2014.

ASCHNER, M. et al. Methylmercury alters glutamate transport in astrocytes. **Neurochemistry International**, v. 37, n. 2, p. 199-206, 2000.

ASCHNER, M. et al. Involvement of glutamate and reactive oxygen species in methylmercury neurotoxicity. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, n. 3, p. 285-291, 2007.

ASCHNER, M.; SYVERSEN, T. Methylmercury: recent advances in the understanding of its neurotoxicity. **Therapeutic drug monitoring**, v.27, n.3, p. 278-83, 2005.

BAKER, M.J.; TATSUTA, T.; LANGER, T. Quality control of mitochondrial proteostasis. **Cold Spring Harbor Perspective Biology**, v.1, n.3. 1-19, 2011

BAKIR, F. et al. Methylmercury poisoning in Iraq. **Science**, v. 181, n. 96, p. 230-241, 1973.

BALABAN R.S.; NEMOTO, S.; FINKEL, T. Mitochondria, Oxidants, and Aging. **Cell**, v. 120, p.483–495, 2005.

BALLATORI, N. Transport of toxic metals by molecular mimicry. **Environmental Health Perspectives**, v. 110, n. 5, p. 689, 2002.

BELLETTI, S. et al. Time course assessment of methylmercury effects on C6 glioma cells: submicromolar concentrations induce oxidative DNA damage and apoptosis. **Journal of Neuroscience Research**, v. 70, p.703–711, 2002.

BENTIVOGLIO, M.; MAZZARELLO, P. The history of radial glia. **Brain Research Bulletin**, v. 49, n. 5, p. 305-315, 1999.

BENARD, G.; ROSSIGNOL, R. Ultrastructure of the mitochondrion and its bearing on function and bioenergetics. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 10, n.8, p. 1313-42, 2008.

BERTOSSI, M. et al. Effects of methylmercury on the microvasculature of the developing brain. **Neurotoxicology**, v. 25, n. 5, p. 849-857, 2004.

BONACKER, D. et al. Genotoxicity of inorganic mercury salts based on disturbed microtubule function. **Archives of Toxicology**, v. 78, n. 10, p. 575-583, 2004.

BOSE-O'REILLY, S. et al. Mercury exposure and children's health. **Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care**, v. 40, n.8, p.186-215, 2010.

BRASIL. Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos DINAL. Portaria nº 685 de 27 de agosto de 1998: Princípios Gerais para o Estabelecimento de Níveis Máximos de Contaminantes Químicos em Alimentos e seu Anexo: Limites máximos de tolerância para

contaminantes inorgânicos. **Diário Oficial da União**, v. 1, p. 1415-1437, 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n. 518, de 25 de março de 2004: Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, v. 26, p. 266-70, 2004.

BRASIL. CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente, Resolução No 357 de 17 de Março de 2005: Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, v. 18, p. 1-9, 2005.

BRIDGES, C. C.; ZALUPS, R. K. Transport of inorganic mercury and methylmercury in target tissues and organs. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B**, v. 13, n. 5, p. 385-410, 2010.

BURGER, J.; GOCHFELD, M. Effects of lead on birds (Laridae): a review of laboratory and field studies. **Journal of Toxicology and Environmental Health Part B: Critical Reviews**, v. 3, n. 2, p. 59-78, 2000.

BURKE, K. et al. Methylmercury (MeHg) elicits acute and long-term effects on neurogenesis in the neonatal rat hippocampus selectively. **Neurotoxicology**, In: Proceedings of the 21st international neurotoxicology conference: infant and child neurotoxicology studies: subtle and long term effects, p.726-727, 2004.

BURKE, K. et al. Methylmercury elicits rapid inhibition of cell proliferation in the developing brain and decreases cell cycle regulator, cyclin E. **Neurotoxicology**, v. 27, n. 6, p. 970-981, 2006.

BUZANSKA, L. et al. A human stem cell-based model for identifying adverse effects of organic and inorganic chemicals on the developing nervous system. **Stem Cells**. v.27, n.10, p.2591-260, 2009.

BYLUND, M. et al. Vertebrate neurogenesis is counteracted by Sox1–3 activity. **Nature neuroscience**, v. 6, n. 11, p. 1162-1168, 2003.

CADIGAN, K.M.; NUSSE, R. Wnt signaling: a common theme in animal development. **Genes and Development**, v.11, p.3286-3305, 1997.

CAMPELLO, S.; SCORRANO, L. Mitochondrial shape changes: orchestrating cell pathophysiology. **EMBO reports**, v. n.9, p. 678-84, 2010.

CASTOLDI, A. F. et al. Early acute necrosis, delayed apoptosis and cytoskeletal breakdown in cultured cerebellar granule neurons exposed to methylmercury. **Journal of Neuroscience Research**, v. 59, n. 6, p. 775-787, 2000.

CASTOLDI, A. F. et al. Neurotoxicity and molecular effects of methylmercury. **Brain research Bulletin**, v. 55, n. 2, p. 197-203, 2001.

CARRANZA-ROSALES, P. et al. Morphologic and functional alterations induced by low doses of mercuric chloride in the kidney OK cell line: ultrastructural evidence for an apoptotic mechanism of damage. **Toxicology**, v. 210, p. 111-21, 2005.

CARVALHO, M. C. et al. Behavioral, morphological, and biochemical changes after *in ovo* exposure to methylmercury in chicks. **Toxicological Sciences**, v. 106, n. 1, p. 180-185, 2008.

ÇAVAS, T. In vivo genotoxicity of mercury chloride and lead acetate: Micronucleus test on acridine orange stained fish cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p.352–358, 2008.

CEBULSKA-WASILEWSKA, A. et al. Occupational exposure to mercury vapour on genotoxicity and DNA repair. **Mutation research**, v. 586, n. 2, p. 102-14, 2005.

CECCATELLI, S; ASCHNER, M. Methylmercury and neurotoxicity: **Current Topics in Neurotoxicity II**. New York: Springer, 2005. p. 109-118.

CECCATELLI, S.; DARÉ, E.; MOORS, M. Methylmercury-induced neurotoxicity and apoptosis. **Chemico-biological interactions**, v. 188, n. 2, p. 301-308, 2010.

- CEREGHETTI, G.M.; SCORRANO L. The many shapes of mitochondrial death. **Oncogene**, v. 25, n.34, p. 4717-24, 2006.
- CHAMBARD, J.C. et al. ERK implication in cell cycle regulation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1773, n.8, p.1299-1310, 2007.
- CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiological Reviews Published**, v. 59 n. 3, p. 527-605, 1979.
- CHARGUI, A. et al. Cadmium-induced autophagy in rat kidney: an early biomarker of subtoxic exposure. **Toxicological Sciences**, v.121, p. 31-42, 2011.
- CHATTERJEE, S. et al. Low concentration of mercury induces autophagic cell death in rat hepatocytes. **Toxicology and Industrial Health**, v.30, n.7, p. 611-620, 2014.
- CHEN, H.; MCCAFFERY, J.M.; CHAN, D.C. Mitochondrial fusion protects against neurodegeneration in the cerebellum. **Cell**, v.130, n.3, p. 548-62, 2007.
- CHOI, B.H. et al. Abnormal neuronal migration, deranged cerebral cortical organization, and diffuse white matter astrogliosis of human fetal brain: a major effect of methylmercury poisoning in utero. **Journal of neuropathology and experimental neurology**, v.37, n. 6, p.719-33, 1978.
- CHOI, B.H. Excitotoxic cell death. **Journal of neurobiology**, v.9, p. 1261-76, 1992.
- CHOW, E. S. H et al. Cadmium inhibits neurogenesis in zebrafish embryonic brain development. **Aquatic toxicology**, v. 87, n. 3, p. 157-169, 2008.
- CLARKSON, T. W. et al. Tests of efficacy of antidotes for removal of methylmercury in human poisoning during the Iraq outbreak. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 218, n.1, p.74-83, 1981.

CLARKSON, T. W.; MAGOS, L.; MYERS, G. J. The Toxicology of Mercury - Current Exposures and Clinical Manifestations. **New England Journal of Medicine**, v. 349, n. 18, p. 1731-1737, 2003.

CLARKSON, T. W.; MAGOS, L. The Toxicology of Mercury and Its Chemical Compounds. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 36, n. 8, p. 609-662, 2006.

CHAMBARD, J.C. et al. ERK implication in cell cycle regulation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1773, n.8, p.1299-1310, 2007.

COLAS, J.-F.; SCHOENWOLF, G. C. Towards a cellular and molecular understanding of neurulation. **Developmental Dynamics**, v. 221, n. 2, p. 117-145, 2001.

COSTA, L. G. et al. Developmental neuropathology of environmental agents. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 44, p. 87, 2004.

CORNELL, R. A.; EISEN, J. S. Notch in the pathway: The roles of Notch signaling in neural crest development. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 16, n. 6, p. 663-672, 2005.

CRESPO-LÓPEZ, M. E. et al. Methylmercury genotoxicity: a novel effect in human cell lines of the central nervous system. **Environment International**, v. 33, n. 2, p. 141-146, 2007.

CRESPO-LÓPEZ, M. E. et al. Mercury and human genotoxicity: Critical considerations and possible molecular mechanisms. **Pharmacological Research**, v. 60, p. 212–220, 2009.

CRESPO-LÓPEZ, M. E. et al. Genotoxicity of mercury: Contributing for the analysis of Amazonian populations. **Environment International**, v.37, p. 136–141, 2011.

DANSCHER, G. Histochemical demonstration of heavy metals. **Histochemistry**, v. 71, n. 1, p. 1-16, 1981.

DARE', E. et al. Antioxidants J811 and 17beta-estradiol protect cerebellar granule cells from methylmercury-induced apoptotic cell death. **Journal of neuroscience research**, v.62,p. 557–565, 2000.

DAS, S.; NAGESHWAR RAO, B.; SATISH RAO, B. Mangiferin attenuates methylmercury induced cytotoxicity against IMR-32, human neuroblastoma cells by the inhibition of oxidative stress and free radical scavenging potential. **Chemico-Biological Interactions**, v. 193, n. 2, p. 129-140, 2011.

DIETRICH, M. O. et al. Exercise affects glutamate receptors in postsynaptic densities from cortical mice brain. **Brain Research**, v. 1065, n. 1, p. 20-25, 2005.

DOLBEC, J. et al. Methylmercury exposure affects motor performance of a riverine population of the Tapajos river, Brazilian Amazon. **International Archives of Occupational and Environmental Health**, v. 73, n. 3, p. 195-203, 2000.

DONG, Z. et al. Promotion of autophagy and inhibition of apoptosis by low concentrations of cadmium in vascular endothelial cells. **Toxicology In Vitro**, v. 23, p. 105–110, 2009.

DÓREA, J. G.; FARINA, M.; ROCHA, J. B. T. Toxicity of ethylmercury (and Thimerosal): a comparison with methylmercury. **Journal of Applied Toxicology**, v. 33, n. 8, p. 700-711, 2013.

DOSSEF, A.L. Apoptosis: the sculptor of development. **Stem Cells Development**, v.13, n.5, p.473-83, 2004.

DRINGEN, R. Metabolism and functions of glutathione in brain. **Progress in neurobiology**, v. 62, n.6, p.649-71, 2000.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological reviews**, v. 82, n.1, p. 47-95, 2002.

EGAN, D.F. et al. Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. **Science**, v.331, n.6016, p.456-61, 2011.

EPA-United States Environmental Protection Agency. Mercury study report to congress: health effects of mercury and mercury compounds. EPA-4562/R-97- 007. Washington, DC, USA: U.S. EPA; 1997.

ERICSON, J. et al. Early stages of motor neuron differentiation revealed by expression of homeobox gene *Isl-1*. **Science**, v.256, p. 1555–1560, 1992.

ERICSON, J. et al. Sonic hedgehog induces the differentiation of ventral forebrain neurons: A common signal for ventral patterning within the neural tube. **Cell**, v.81, n.5, p.747–756, 1995.

ETO, K. et al. Differential diagnosis between organic and inorganic mercury poisoning in human cases-the pathologic point of view. **Toxicologic Pathology**, v. 27, n. 6, p. 664-671, 1999.

FALLUEL-MOREL, A. et al. Developmental mercury exposure elicits acute hippocampal cell death, reductions in neurogenesis, and severe learning deficits during puberty. **Journal of Neurochemistry**, v. 103, n. 5, p. 1968-1981, 2007.

FARINA, M. et al. Methylmercury Increases Glutamate Release from Brain Synaptosomes and Glutamate Uptake by Cortical Slices from Suckling Rat Pups: Modulatory Effect of Ebselen. **Toxicological Sciences**, v. 73, n. 1, p. 135-140, 2003.

FARINA, M.; ASCHNER, M.; ROCHA, J. B. Oxidative stress in MeHg-induced neurotoxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 256, n. 3, p. 405-417, 2011a.

FARINA, M.; ROCHA, J.B.; ASCHNER, M. Mechanisms of methylmercury-induced neurotoxicity: Evidence from experimental studies. **Life Sciences**, v. 89, p. 555–563, 2011b.

FARINA, M. et al. Metals, oxidative stress and neurodegeneration: A focus on iron, manganese and mercury. **Neurochemistry International**, v. 62, n. 5, p. 575-594, 2013.

FAUSTMANN, E.M. et al. Investigations of methylmercury-induced alterations in neurogenesis. **Environmental Health Perspectives**, v. 110, n.5, p.859-64, 2002.

FEATHERSTONE, R.E.; KAPUR, S.; FLETCHER, P.J. The amphetamine-induced sensitized state as a model of schizophrenia. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v.31, p.1556–1571, 2007.

FERRARO, L. et al. Developmental exposure to methylmercury elicits early cell death in the cerebral cortex and long-term memory deficits in the rat. **International journal of developmental neuroscience**, v. 27, n.2, p.165-174, 2009.

FRANCHI, R. et al. Cytogenetic monitoring of fishermen with environmental mercury exposure. *Mutation Research*, v.320, n.1–2, p.23–29, 1994.

FRANCO, J. L. et al. Lactational exposure to inorganic mercury: evidence of neurotoxic effects. **Neurotoxicology and teratology**, v. 29, n. 3, p. 360-367, 2007.

FRANCO, J. L. et al. Methylmercury neurotoxicity is associated with inhibition of the antioxidant enzyme glutathione peroxidase. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 47, n. 4, p. 449-457, 2009.

FRANCO, S.J. et al: Fate-Restricted Neural Progenitors in the Mammalian Cerebral Cortex. **Science** v. 337, n. 6095, p. 746-749, 2012.

FRANK, M. et al. Mitophagy is triggered by mild oxidative stress in a mitochondrial fission dependent manner. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1823, p.2297–2310, 2012.

FUJIMURA, M. et al. Methylmercury exposure downregulates the expression of Rac1 and leads to neuritic degeneration and ultimately apoptosis in cerebrocortical neurons. **Neurotoxicology**, v. 30, p.16–22, 2009.

FUJIMURA, M.; CHENG, J.; ZHAO, W. Perinatal exposure to low-dose methylmercury induces dysfunction of motor coordination with decreases in synaptophysin expression in the cerebellar granule cells of rats. **Brain Research**, v. 1464, p. 1-7, 2012.

FRIEDMAN, J.R. et al. ER Tubules Mark Sites of Mitochondrial Division. **Science**, v. 334, n. 6054, p. 358-362, 2011.

FREDERICK, R.L.; SHAW, J.M. Moving mitochondria: establishing distribution of an essential organelle. **Traffic**, v. 8, n.12, p.1668-75, 2007.

FREY, T.G.; MANNELLA, C.A. The internal structure of mitochondria. **Trends in biochemical sciences**, v.25, n.7, p. 319-24, 2000.

FULDA, S. et al. Cellular stress responses: cell survival and cell death. **International Journal of cell biology**, v. 2010, n. 214074, p.1-23, 2010.

GASSO, S. et al. Antioxidant compounds and Ca²⁺ pathway blockers differentially protect against methylmercury and mercuric chloride neurotoxicity. **Journal of neuroscience research**, v.66, p.135 – 145, 2001.

GLASER, V. et al. Oxidative stress-mediated inhibition of brain creatine kinase activity by methylmercury. **Neurotoxicology**, v. 31, p. 454–460, 2010.

GLASER, V. et al. Diphenyl diselenide administration enhances cortical mitochondrial number and activity by increasing hemoxygenase type 1 content in a methylmercury-induced neurotoxicity mouse model. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 390, n. 1-2, p. 1-8, 2014.

GOCHFELD, M. Cases of mercury exposure, bioavailability, and absorption. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 56, n. 1, p. 174-179, 2003.

GRANDJEAN, P. et al. Cognitive deficit in 7-year-old children with prenatal exposure to methylmercury. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 19, n. 6, p. 417-428, 1997.

GRANDJEAN, P.; LANDRIGAN, P. J. Developmental neurotoxicity of industrial chemicals. **The Lancet**, v. 368, n. 9553, p. 2167-2178, 2006.

GRANDJEAN, P. et al. Adverse effects of methylmercury: environmental health research implications. **Environmental health perspectives**, v. 118, n. 8, p. 1137, 2010.

GRANDJEAN, P.; HERZ, K.T. Methylmercury and brain development: imprecision and underestimation of developmental neurotoxicity in humans. **The Mount Sinai journal of medicine**, v. 78, n.1, p.107-18, 2011.

GRIBBLE, E.J.; Hong, S.W.; FAUSTMAN, E.M. The magnitude of methylmercury-induced cytotoxicity and cell cycle arrest is p53-dependent. **Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology**, v.73, p.29–38,2005

GRINTAL, B et al. Inhibition of astroglial glutamate transport by polyunsaturated fatty acids: evidence for a signalling role of docosahexaenoic acid. **Neurochemistry international**, v.54,n.8, p.535-43, 2009.

GROTTO, D. et al. Mercury exposure and oxidative stress in communities of the Brazilian Amazon. **The Science of the total environment**, v.408, n.4, p.806-11, 2010

GUO, B.Q. et al. Low level prenatal exposure to methylmercury disrupts neuronal migration in the developing rat cerebral cortex. **Toxicology**, v. 304, p.57– 68, 2013.

HALLIWELL, B.; CHIRICO S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. **The American journal of clinical nutrition**, v.57, n.5:715S-724S, 1993.

HARADA, M. Minamata disease: methylmercury poisoning in Japan caused by environmental pollution. **CRC Critical Reviews in Toxicology**, v. 25, n. 1, p. 1-24, 1995.

HAMBURGER, V.; HAMILTON, H. L. A series of normal stages in the development of the chick embryo. **Journal of Morphology**, v. 88, n. 1, p. 49-92, 1951.

HARA, Y. et al. Presynaptic mitochondrial morphology in monkey prefrontal cortex correlates with working memory and is improved with estrogen treatment. **Proceedings of the National Academy of Science of United States of America**, v.111,p.486–491, 2014.

HARPER, J.W. et al. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. **Cell**, v. 75, n. 4, p. 805-816, 1993.

HASSAN, S.A.; MOUSSA, E.A.; ABBOT, L.C. The effect of methylmercury exposure on early central nervous system development in the zebrafish (*Danio rerio*) embryo. **Journal of Applied Toxicology**, v. 32, p.707–13, 2011.

HE, X. et al. Effects of methylmercury exposure on neuronal differentiation of mouse and human embryonic stem cells. **Toxicology Letters**, v. 212, n. 1, p. 1-10, 2012.

HEAD, B. et al. Inducible proteolytic inactivation of OPA1 mediated by the OMA1 protease in mammalian cells. **The Journal of cell biology**, v. 187, n.7, p. 959-966, 2009.

HEINZ, G. et al. Factors affecting the toxicity of methylmercury injected into eggs. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 50, n. 2, p. 264-279, 2006.

HEINZ, G. H. et al. Species differences in the sensitivity of avian embryos to methylmercury. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 56, n. 1, p. 129-138, 2009.

HERCULANO, A.M.et al. Methylmercury intoxication induces nitric oxide synthase activation in retinal cell culture. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.39, p. 415–8, 2006

HINTELMANN, H. Organomercurials. Their formation and pathways in the environment. **Metal ions in life sciences**, v. 7, p. 365-401, 2010.

HOLLENBERG, S.M.; CINEL, I. Bench-to-bedside review: nitric oxide in critical illness—update. **Critical care**,v.13, n.4, 218, 2009.

<http://www.mercury.utah.gov>, acessado em 21 de julho de 2015.

HUYCK, R.W.et al. Methylmercury exposure during early *Xenopus laevis* development affects cell proliferation and death but not neural progenitor specification. **Neurotoxicology and Teratology**,v. 47, p.102-13, 2015

HYTTEL, P.; SINOWATZ, F.; VEJLSTED, M. **Embriologia Veterinária**. 1.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012. p.21.

INOUE, M.; KAJIWARA, Y. Placental transfer of methylmercury and mercuric mercury in mice. **Environmental Medicine**, v. 34, p. 169-172, 1990.

ITOH, K. et al., Mitochondrial dynamics in neurodegeneration. **Trends in Cell Biology**, v.23, n.22, p. 64-71, 2013

JEBBETT, N. J. et al. Low level methylmercury enhances CNTF-evoked STAT3 signaling and glial differentiation in cultured cortical progenitor cells. **Neurotoxicology**, v. 38, p. 91-100, 2013.

KAJIWARA, Y. et al. Methylmercury transport across the placenta via neutral amino acid carrier. **Archives of toxicology**, v. 70, n. 5, p. 310-314, 1996.

KEHRIG, H. A. et al. Bioconcentração e biomagnificação de metilmercúrio na baía de Guanabara. **Química Nova**, v. 34, n. 3, p. S1, 2011.

KHOBTA, A. et al. Gene silencing induced by oxidative DNA base damage: association with local decrease of histone H4 acetylation in the promoter region. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. 13, p. 4285-4295, 2010.

KITSERA, N. et al. 8-Oxo-7, 8-dihydroguanine in DNA does not constitute a barrier to transcription, but is converted into transcription-blocking damage by OGG1. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. 14, p. 5926-5934, 2011.

KLIONSKY D.J., et al.. How shall I eat thee? **Autophagy** , v.3, n.5, p.413–62, 2007.

KOCH, A. et al. A Role for Fis1 in Both Mitochondrial and Peroxisomal Fission in Mammalian Cells. **Molecular Biology of the Cell**, v.16, p. 5077–5086, 2005.

KOFF, A. et al. Formation and activation of a cyclin E-cdk2 complex during the G1 phase of the human cell cycle. **Science**, v. 257, n. 5077, p. 1689-1694, 1992.

KNOTT, A.B. et al. Mitochondrial fragmentation in neurodegeneration. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 9, p. 505–518, 2008.

KOMATSU, M. et al. Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. **The Journal of cell biology**, v.169, n.3, p.425-34, 2005.

LAWTON, M. et al. Reduced tubulin tyrosination as an early marker of mercury toxicity in differentiating N2a cells. **Toxicology in Vitro**, v. 21, n. 7, p. 1258-1261, 2007.

LE DOUARIN, N. M. et al. Neural crest cell plasticity and its limits. **Development**, v. 131, n. 19, p. 4637-4650, 2004.

LEE, M. K.; REBHUN, L. I.; FRANKFURTER, A. Posttranslational modification of class III beta-tubulin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 87, n. 18, p. 7195-7199, 1990.

LENT, R. **Cem Billhões de Neurônios: Conceitos Fundamentais de Neurociência**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2002. p.698.

LEVINE, B.; KLIONSKY, D.J. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. **Developmental cell**, v. 6, n.4, p. 463-77, 2004.

LIONETTI, L. et al. high-lard and high-fish-fil diets differ in their effects on function and dynamic behaviour of rat hepatic mitochondria. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, e92753.

LIU, X.; HAJNÓCZKY, G. Altered fusion dynamics underlie unique morphological changes in mitochondria during hypoxia-reoxygenation stress. **Cell death and differentiation**, v.18, n. 10, p.1561-72, 2011.

LOWERY, L. A.; SIVE, H. Strategies of vertebrate neurulation and a re-evaluation of teleost neural tube formation. **Mechanisms of Development**, v. 121, n. 10, p. 1189-1197, 2004.

LU, T.-H. et al. Involvement of oxidative stress-mediated ERK1/2 and p38 activation regulated mitochondria-dependent apoptotic signals in methylmercury-induced neuronal cell injury. **Toxicology Letters**, v. 204, n. 1, p. 71-80, 2011.

MCCORD, J.M.; DAY, E.D. Jr. Superoxide-dependent production of hydroxyl radical catalyzed by iron-EDTA complex. **Federation of European Biochemical Societies letters**, v. 86, n. 1, p.139-42, 1978.

MACVICAR, T. D. Mitophagy. **Essays in biochemistry**, v. 55, p.93-104, 2013.

MACVICAR, T.D.; MANNACK, L.V.; LEES, R.M.;LANE, J.D. Targeted siRNA Screens Identify ER-to-Mitochondrial Calcium Exchange in Autophagy and Mitophagy Responses in RPE1 Cells.**International journal of molecular sciences**, v.16, n.6, p.13356-80, 2015.

MAGALDI, M. A. **Construcciones manejo y alimentación**. In: Produccion de aves. Argentina: Cathebra, 1974. p.259 – 278.

MALLO, M.; WELLIK, D. M.; DESCHAMPS, J. Hox genes and regional patterning of the vertebrate body plan. **Developmental Biology**, v. 344, n. 1, p. 7-15, 2010.

MANFROI, C. et al. Maternal milk as methylmercury source for suckling mice: neurotoxic effects involved with the cerebellar glutamatergic system. **Toxicological Sciences**, v. 81, n. 1, p. 172-178, 2004.

MAHAFFEY, K.R. et al. Balancing the benefits of n-3 polyunsaturated fatty acids and the risks of methylmercury exposure from fish consumption. **Nutrition Reviews**, v.69, n.9, p. 493–508, 2011.

MAMBER, C. et al. GFAP δ Expression in Glia of the Developmental and Adolescent Mouse Brain. **PLoS ONE** v.7, n.12, e52659, 2012.

MATSUMOTO, H.; KOYA, G.; TAKEUCHI, T. Fetal Minamata disease. A neuropathological study of two cases of intrauterine intoxication by a methyl mercury compound. **Journal of neuropathology and experimental**, v.24, n. 4, p. 563-74, 1965.

MEIJER, W.H. et al. ATG genes involved in non-selective autophagy are conserved from yeast to man, but the selective Cvt and pexophagy pathways also require organism-specific genes. **Autophagy**, v. 3, n.2, p.106-16, 2007.

MELDRUM, B.S. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. **The Journal of nutrition**, v.130, n.4S, p.1007S-15S, 2000.

MIURA, K. et al. The involvement of microtubular disruption in methylmercury-induced apoptosis in neuronal and nonneuronal cell lines. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 160, n. 3, p. 279-288, 1999.

MIURA, K.; INOKAWA, M.; IMURA, N. Effects of methylmercury and some metal ions on microtubule networks in mouse glioma cells and *in vitro* tubulin polymerization. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 73, n. 2, p. 218-231, 1984.

MOREL, F. M.; KRAEPIEL, A. M.; AMYOT, M. The chemical cycle and bioaccumulation of mercury. **Annual review of ecology and systematics**, v. 29, n. 1, p. 543-566, 1998.

MORI, N.; YASUTAKE, A.; HIRAYAMA, K. Comparative study of activities in reactive oxygen species production/defense system in mitochondria of rat brain and liver, and their susceptibility to methylmercury toxicity. **Archives of Toxicology**, v. 81, p. 769–776, 2007.

MÜLLER, Y. M. R. et al. Behavioral impairments related to lead-induced developmental neurotoxicity in chicks. **Archives of Toxicology**, v. 82, p.445–451, 2008.

MÜLLER, Y. M. R. et al. Prenatal lead acetate exposure induces apoptosis and changes GFAP expression during spinal cord development. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 75, p. 223-229, 2012.

MYERS, G.J. et al. Prenatal methylmercury exposure from ocean fish consumption in the Seychelles child development study. **Lancet**, v. 361, n.9370, p.1686-1692, 2003.

NAGASHIMA, K. et al. Apoptotic process of cerebellar degeneration in experimental methylmercury intoxication of rats. **Acta neuropathologica**, v.91, n.1, v.72-77, 1996.

NI, M. et al. Comparative study on the response of rat primary astrocytes and microglia to methylmercury toxicity. **Glia**, v.59, n.5, p.810-20, 2011.

NI, W. et al. Associations of neonatal lead, cadmium, chromium and nickel co-exposure with DNA oxidative damage in an electronic waste recycling town. **Science of the Total Environment**, v. 472 , p354–362, 2014.

NOGUSHI, Y. et al. Astrocytes protect neurons against methylmercury via ATP/P2Y(1) receptor-mediated pathways in astrocytes. **PLoS One**, v. 8, n.2, e57898, 2013.

NORBACK, D.H.; ALLEN J.R. Chlorinated aromatic hydrocarbon induced modifications of the hepatic endoplasmic reticulum: concentric membrane arrays. **Environmental health perspectives**, v.1, p.137-43, 1972.

OCHI, T. Methylmercury, but not inorganic mercury, causes abnormality of centrosome integrity (multiple foci of γ -tubulin), multipolar spindles and multinucleated cells without microtubule disruption in cultured Chinese hamster V79 cells. **Toxicology**, v. 175, n. 1, p. 111-121, 2002.

OKAMOTO, K.; SHAW, J.M. Mitochondrial morphology and dynamics in yeast and multicellular eukaryotes. **Annual review of genetics**, v. 39, p.503-536, 2005.

OLICHON, A. et al. Loss of OPA1 perturbs the mitochondrial inner membrane structure and integrity, leading to cytochrome c release and apoptosis. **The Journal of biological chemistry**, v. 278, p.7743–7746, 2003.

OU, Y. C. et al. Induction of the Cell Cycle Regulatory Gene p21 (Waf1, Cip1) Following Methylmercury Exposure *in vitro* and *in vivo*. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 157, n. 3, p. 203-212, 1999.

PARRAN, D. K.; BARONE JR, S.; MUNDY, W. R. Methylmercury inhibits TrkA signaling through the ERK1/2 cascade after NGF stimulation of PC12 cells. **Developmental Brain Research**, v. 149, n. 1, p. 53-61, 2004.

PASSOS, C.J.S. et al. Daily mercury intake in fish-eating populations in the Brazilian Amazon. **Epidemiol Journal of exposure science and environmental epidemiology**, v. 18, p. 76–87, 2008.

PATEL, E.; REYNOLDS, M. Methylmercury impairs motor function in early development and induces oxidative stress in cerebellar granule cells. **Toxicology Letters**, v. 222, n.3, p.265–272, 2013.

PIVOVAROVA, N.B.; ANDREWS, S.B. Calcium-dependent mitochondrial function and dysfunction in neurons. **Federation of European Biochemical Societies Journal**. V.277, n.18, p.3622-36, 2010.

POLUNAS, M. et al. Role of oxidative stress and the mitochondrial permeability transition in methylmercury cytotoxicity. **Neurotoxicology**, v. 32, n. 5, p. 526-534, 2011.

PONCE, R.A. et al. Effects of methyl mercury on the cell cycle of primary rat CNS cells in vitro. **Toxicology and Applied Pharmacol**, v. 127, n.1, p.83-90, 1994.

POURLIS, A.F. Developmental malformation in avian species. Manifestation of unknown or genetic etiology – a review. **Asian Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 6, n.5, 401-415, 2011.

RAMANATHAN, G.; ATCHISON, W. D. Ca²⁺ entry pathways in mouse spinal motor neurons in culture following *in vitro* exposure to methylmercury. **NeuroToxicology**, v. 32, n. 6, p. 742-750, 2011.

ROCHA, C.A.M. **Avaliação da genotoxicidade do cloreto de metilmercúrio em duas espécies de peixes neotropicais**. Tese

(Doutorado em Neurociências e Biologia Celular)- Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará.

ROCHA, C. et al. Comet assay and micronucleus test in circulating erythrocytes of *Aequidens tetramerus* exposed to methylmercury. **In Vivo**, v. 25, n. 6, p. 929-933, 2011.

RODIER, P.M.; ASCHNER, M.; SAGER, P.R. Mitotic arrest in the developing CNS after prenatal exposure to methylmercury. **Neurobehavioral toxicology and teratology**, v.6, n.5, p.379-385, 1984.

ROZTOCIL, T. et al. NeuroM, a neural helix-loop-helix transcription factor, defines a new transition stage in neurogenesis. **Development**, v. 124, n. 17, p. 3263-3272, 1997.

RUGARLI, E.I.; LANGER, T. Mitochondrial quality control: a matter of life and death for neurons. **The EMBO journal**, v. 31, n.6, p.1336-1349, 2012.

SÁ et al. Human exposure to mercury in the west region of Pará State. **Revista Paraense de Medicina**, v. 20, p.19–25, 2006.

SAGER, P.; DOHERTY, R.; OLMSTED, J. Interaction of methylmercury with microtubules in cultured cells and *in vitro*. **Experimental Cell Research**, v. 146, n. 1, p. 127-137, 1983.

SAKAMOTO, M. et al. Evaluation of changes in methylmercury accumulation in the developing rat brain and its effects: a study with consecutive and moderate dose exposure throughout gestation and lactation periods. **Brain Research**, v. 949, n. 1, p. 51-59, 2002.

SAKAMOTO, M. et al. Dose-dependent effects of methylmercury administered during neonatal brain spurt in rats. **Developmental Brain Research**, v.152, n.2, p.171–176, 2004.

SANTEL, A.; FULLER, M.T. Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. **Journal of cell science**, v.114, n. 5, p.867-74, 2001.

SCHOENWOLF, G. C.; DELONGO, J. Ultrastructure of secondary neurulation in the chick embryo. **American Journal of Anatomy**, v. 158, n. 1, p. 43-63, 1980.

SCHOENWOLF, G. C et al. **Larsen- Embriologia Humana**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. p.100-120.

SHARPE, M.A. et al. Thimerosal-derived ethylmercury is a mitochondrial Toxin in Human Astrocytes: Possible Role of Fenton Chemistry in the Oxidation and Breakage of mtDNA **Journal of Toxicology**. v. 2012, p.1-12, 2012.

SMIRNOVA et al. Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. **Molecular biology of the cell**, v.12, n.8, p.2245-56, 2001.

SMITH, J. L.; SCHOENWOLF, G. C. Neurulation: coming to closure. **Trends in Neurosciences**, v. 20, n. 11, p. 510-517, 1997.

SOKOLOWSKI, K. et al. Methylmercury (MeHg) elicits mitochondrial-dependent apoptosis in developing hippocampus and acts at low exposures. **Neurotoxicology**, v. 32, n. 5, p. 535-544, 2011.

STERN, C. D. The chick: a great model system becomes even greater. **Developmental Cell**, v. 8, n. 1, p. 9-17, 2005.

STEIN, R. et al. The NGF-inducible SCG10 mRNA encodes a novel membrane-bound protein present in growth cones and abundant in developing neurons. **Neuron**, v. 1, n. 6, p. 463-476, 1988.

STOIBER, T. et al. Disturbed microtubule function and induction of micronuclei by chelate complexes of mercury(II). **Mutation Research**, v. 563, p. 97–106, 2004.

STRINGARI, J. et al. Prenatal methylmercury exposure hampers glutathione antioxidant system ontogenesis and causes long-lasting oxidative stress in the mouse brain. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 227, n. 1, p. 147-154, 2008.

SYVERSEN, T.; KAUR, P. The toxicology of mercury and its compounds. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 26, n. 4, p. 215-226, 2012.

TAKAMATSU, T.; FUJITA, S. Growth of Notochord and Formation of Cranial and Mesencephalic Flexures in Chicken Embryo. **Development, Growth & Differentiation**, v.9, n.5, p. 497–502, 1987.

TAMM, C.D. et al. High susceptibility of neural stem cells to methylmercury toxicity: effects on cell survival and neuronal differentiation. **Journal of Neurochemistry**, v.97, n.1, p.69-78, 2006.

TANAKA, A. et al. Proteasome and p97 mediate mitophagy and degradation of mitofusins induced by Parkin. **The Journal of cell biology**, v.191, p.1367–1380, 2010.

TAVARES, T. M.; CARVALHO, F. M. Avaliação de exposição de populações humanas a metais pesados no ambiente: exemplos do Recôncavo Baiano. **Química nova**, v. 15, n. 2, p. 147-154, 1992.

THEUNISSEN, P. T. et al. Time-response evaluation by transcriptomics of methylmercury effects on neural differentiation of murine embryonic stem cells. **Toxicological Sciences**, v. 122, n. 2, p. 437-447, 2011.

THIER, R. et al. Interaction of metal salts with cytoskeletal motor protein systems. **Toxicology Letters**, v. 140-141, p. 75-81, 2003.

THOMPSON, J. M., AND BANNIGAN, J. G. Omphalocele induction in the chick embryo by administration of cadmium. **Journal of Pediatric Surgery**, v.42,p.1703–1709, 2007.

TWIG, G. et al. Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. **The EMBO journal**, v.27, n.2, p.433-46, 2008.

UFER, C.;WANG,C.C. The Roles of Glutathione Peroxidases during Embryo Development. **Frontiers in molecular neuroscience**, v.4, n.12, 1-14, 2011.

USUKI, F.; FUJITA, E.; SASAGAWA, N. Methylmercury activates ASK1/JNK signaling pathways, leading to apoptosis due to both mitochondria- and endoplasmic reticulum (ER)-generated processes in myogenic cell lines. **Neurotoxicology**, v. 29, n.1, p. 22-30, 2008.

VAZQUEZ, M. et al. Intestinal transport of methylmercury and inorganic mercury in various models of Caco-2 and HT29-MTX cells. **Toxicology**, v.311, n.3, p.147-153, 2013.

VIECELI, F. M. et al. The transcription factor chicken Scratch2 is expressed in a subset of early postmitotic neural progenitors. **Gene Expression Patterns**, v. 13, n. 5–6, p. 189-196, 2013.

YORIFUJI, T. et al. Long-term exposure to methylmercury and psychiatric symptoms in residents of Minamata, Japan. **Environment International**, v. 37, n. 5, p. 907-913, 2011.

YOULE RJ1, VAN DER BLIEK AM. Mitochondrial fission, fusion, and stress. **Science**, v. 337, n. 6098, p.1062-5, 2012 .

WASILEWSKI, M.;SCORRANO, L. The changing shape of mitochondrial apoptosis. **Trends in endocrinology and metabolism**, v.20, n.6, p.287-94, 2009.

WATANABE, C. et al. In Utero Methylmercury Exposure Differentially Affects the Activities of Selenoenzymes in the Fetal Mouse Brain. **Environmental Research**, v. 80, n. 3, p. 208-214, 1999.

WATANABE,J. et al. Low dose of methylmercury (MeHg) exposure induces caspase mediated-apoptosis in cultured neural progenitor cells. **The Journal of Toxicological Sciences**, v. 38, n.6, p. 931-935, 2013.

WELLS, P. G. et al. Oxidative DNA damage and repair in teratogenesis and neurodevelopmental deficits. **Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews**, v. 90, n. 2, p. 103-109, 2010.

WHO-IPCS. Environmental health criteria. 101-Methylmercury. Geneva: WHO; 1990.

WOHLGEMUTH, S.E.; CALVANI, R.; MARZETTI, E. The interplay between autophagy and mitochondrial dysfunction in oxidative stress-induced cardiac aging and pathology. **Journal of molecular and cellular cardiology**, v. 71, p.62-70, 2014.

XU, M. et al. Effects of low level of methylmercury on proliferation of cortical progenitor cells. **Brain research**, v. 1359, p. 272-280, 2010.

XU, X. et al. Comparison of neurobehavioral effects of methylmercury exposure in older and younger adult zebrafish (*Danio rerio*).

Neurotoxicology, v. 33, n. 5, p. 1212-1218, 2012.

YAMAMOTO, H. et al. Atg9 vesicles are an important membrane source during early steps of autophagosome formation. **The Journal of cell biology**, v. 198, n.2, p.219-33, 2012.

YOON, Y. et al. The mitochondrial protein hFis1 regulates mitochondrial fission in mammalian cells through an interaction with the dynamin-like protein DLP1. **Molecular Cell Biology**, v. 23, p. 5409–5420, 2003.

ZIMMER, B. et al. Sensitivity of dopaminergic neuron differentiation from stem cells to chronic low-dose methylmercury exposure.

Toxicological Sciences, v. 121, n. 2, p. 357-367, 2011.